

CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS EN CULTIVOS CELULARES PARA SUS APLICACIONES BIOMÉDICAS

CELLULAR STUDIES OF MAGNETIC NANOPARTICLES FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

TESIS DOCTORAL

Macarena Calero Calero



**instituto
imdea
nanociencia**

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias

Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, Noviembre de 2015

Memoria presentada por **Macarena Calero Calero**
para optar al grado de Doctor
por la Universidad Autónoma de Madrid.

Proyecto de Tesis dirigido por la
Dra. **Ángeles Villanueva Oroquieta**
Profesora Titular de Biología Celular de la
Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, Noviembre 2015

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN QUE HAN SUBVENCIONADO ESTA TESIS

CM S0505/MAT-000194 (Nanoestructuras magnéticas: fabricación, propiedades y aplicaciones biomédicas y tecnológicas)

CM S2009/MAT-1726 (Fundamentos y aplicaciones de moléculas, nanopartículas y nanoestructuras magnéticas: de la espintrónica a la biomedicina)

MICINN CTQ2010-20870-C03-03 (Nuevas estrategias para terapia fotodinámica dirigida. 2. Biología)

Unión Europea, VII Programa Marco contrato nº 262943 (Multifunctional Nanotechnology for selective detection and treatment of cancer)

MINECO CTQ2013-48767-C3-3-R (Desarrollo de dispositivos nanoestructurados como plataformas multimodales fototerapéuticas. 2. Biología)

CM S2013/MIT-2850 (Nuevas fronteras del nanomagnetismo fundamental y aplicado)

Tabla de contenidos

ABREVIATURAS	11
ABBREVIATIONS	11
Abreviaturas/Abbreviations	13
RESUMEN	15
ABSTRACT	15
Resumen	17
Abstract	21
INTRODUCCIÓN	25
1. Nanotecnología y Nanomedicina	27
2. Tipos de nanopartículas	29
3. Mecanismos de entrada de las nanopartículas	36
4. Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas magnéticas	39
4.1. NPMs como agentes de diagnóstico	41
4.2. NPMs como agentes terapéuticos: hipertermia	42
4.3. NPMs como agentes terapéuticos: Liberación de fármacos	44
5. Nanotoxicidad	47
6. Muerte celular	52
7. Células madre tumorales	58
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	67
HYPOTHESIS AND OBJECTIVES	67
Hipótesis y Objetivos	69
Hypothesis and Objectives	71
MATERIALES Y MÉTODOS	73
1. Tipos de nanomateriales y fármacos	75
2. Cultivos celulares	79
3. Cultivos primarios	81
4. Internalización de las nanopartículas	82
5. Tinción con azul de Prusia	83
6. Cuantificación de hierro en el interior de las células	83
7. Localización subcelular	84
8. Análisis de los mecanismos de entrada de las NPs en las células	84
8.1. Microscopía óptica: incubación a 4 °C	84
8.2. Microscopía electrónica de transmisión	85

9.	Estudios morfológicos.....	86
9.1.	Microscopía óptica: tinción con rojo neutro.....	86
9.2.	Microscopía óptica: tinción con Hoechst-33258.....	86
9.3.	Microscopía óptica: tinción de secciones de mamíferas con hematoxilina-eosina.....	86
9.4.	Microscopía electrónica de barrido.....	87
10.	Análisis del citoesqueleto y proteínas de adhesión.....	87
10.1.	Inmunofluorescencia indirecta para α -tubulina.....	87
10.2.	Inmunofluorescencia indirecta para vinculina + marcaje con faloidina.....	88
11.	Análisis del ciclo celular.....	88
12.	Detección de estrés oxidativo.....	89
13.	Ensayos de viabilidad celular.....	90
13.1.	Ensayo del MTT.....	90
13.2.	Test del azul Tripán.....	90
14.	Identificación de la muerte celular por la ruta apoptótica mitocondrial.....	91
14.1.	Inmunofluorescencia indirecta para Bax.....	91
14.2.	Inmunofluorescencia indirecta para citocromo C.....	91
14.3.	Inmunofluorescencia indirecta para caspasa-3 activa.....	92
15.	Formación de mamíferas primarias.....	93
16.	Calentamiento.....	94
17.	Aplicación de un campo magnético alterno.....	94
18.	Microscopía óptica.....	95
19.	Análisis estadísticos.....	96

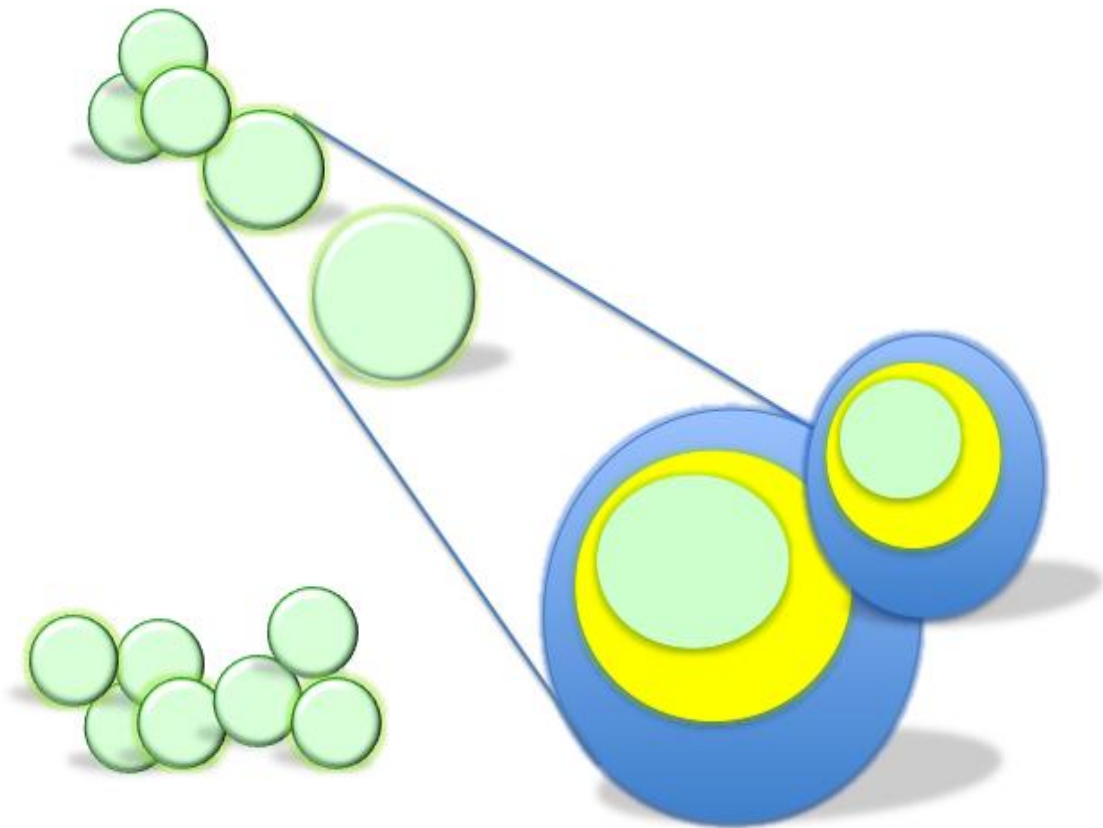
RESULTADOS 97

Capítulo 1: Nanopartículas magnéticas. Análisis de la bicompatibilidad.....97

1.	Caracterización de las nanopartículas magnéticas.....	99
2.	Internalización y acumulación de las NPMs en las células.....	100
3.	Detección de hierro en el interior de las células.....	102
4.	Cuantificación de la acumulación de hierro en el interior celular.....	105
5.	Localización de las nanopartículas magnéticas en orgánulos ácidos.....	107
6.	Mecanismos de internalización de las nanopartículas magnéticas.....	110
6.1.	Mecanismo endocítico.....	110
6.2.	Vías endocíticas: endocitosis mediada por clatrina y macropinocitosis.....	111
7.	Acumulación de las NPMs sin alteración de la morfología celular.....	114
8.	Análisis del citoesqueleto y de la proteína vinculina.....	116
8.1.	Distribución y organización de los microtúbulos sin alteraciones, a excepción de las NPMs de heparina.....	116
8.2.	Organización de los filamentos de actina y de la proteína vinculina sin alteraciones.....	119
9.	Ciclo celular sin alteraciones.....	121
10.	No generación de estrés oxidativo.....	122
11.	Sin alteraciones en la viabilidad celular, a excepción de las NPs de heparina.....	124
12.	Estudios en las células MCF-10A.....	127

Capítulo 2: Nanopartículas magnéticas. Transporte y liberación de fármacos.....	129
1. Detección de la liberación de la doxorrubicina.....	131
2. Efectos citotóxicos inducidos por las nanopartículas unidas a doxorrubicina.....	132
2.1. Descenso de la densidad celular y aumento del tamaño celular	132
2.2. Detección de poliploidía, mitosis aberrantes y apoptosis	133
3. Reducción de la viabilidad celular	135
4. Análisis del citoesqueleto	136
4.1. Alteraciones en la distribución de los microtúbulos.....	136
4.2. Alteración en la organización y distribución de los filamentos de actina	138
5. Reducción de la actividad de las células madres tumorales.....	139
6. Análisis de secciones de mamoesferas incluidas en parafina.....	141
6.1. Alteración en la morfología general de las células que formaban las mamoesferas	141
6.2. Alteración en la organización y distribución de los microtúbulos	142
6.3. Muerte celular apoptótica.....	143
6.3.1 Liberación del citocromo C	143
6.3.2 Activación de la caspasa-3	144
Capítulo 3: Nanopartículas magnéticas. Hipertermia intracelular.....	147
1. Diferente sensibilidad al calentamiento de los distintos tipos celulares.....	149
2. Direccionalidad de NPMs por un campo magnético externo	159
Capítulo 4: Nanopartículas magnéticas. Agentes de contraste.....	161
1. Nanorods	163
2. Nanopartículas revestidas de bismuto	165
DISCUSIÓN	169
1. Biocompatibilidad	172
2. Agentes transportadores de fármacos	184
3. Hipertermia.....	193
4. Agentes de contraste.....	198
CONCLUSIONES.....	203
CONCLUSIONS.....	203
Conclusiones	205
Conclusions.....	207
BIBLIOGRAFÍA	209
PUBLICACIONES RELACIONADAS CON ESTA TESIS.....	225
AGRADECIMIENTOS	227

ABREVIATURAS ABBREVIATIONS



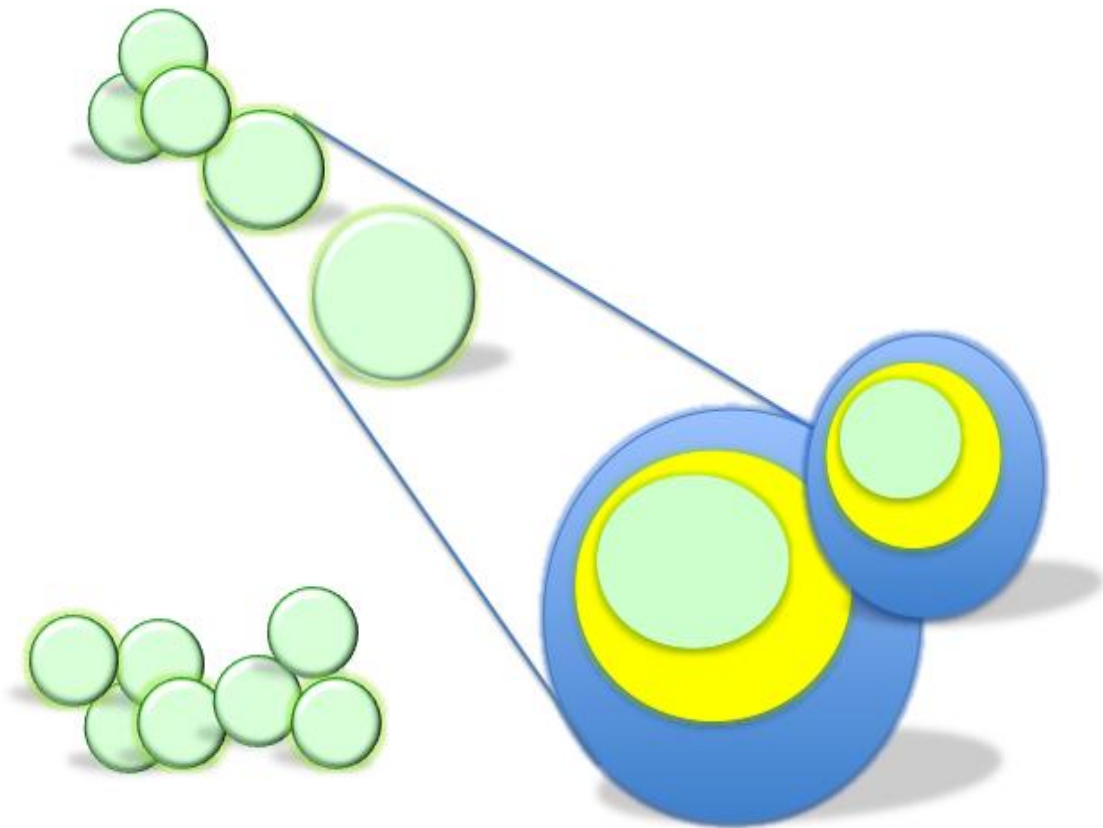
Abreviaturas/Abbreviations

Español	English
AD: Aminodextrano	AD: Aminodextran
ADMS: Ácido Dimercaptosuccínico	DMSA: Dimercaptosuccinic Acid
APS: Aminopropilsilano	APS: Aminopropylsilane
APL: Ácido poli-L-láctico	PLA: Poly-L-lactic Acid
CMTs: Células Madre Tumorales	CSCs: Cancer Stem Cells
D: Dextrano	D: Dextran
DA-DCFH: Diacetato de 2,7-Diclorodihidrofluoresceína	DCFH-DA: 2',7'-dichlorodihydrofluorescein Diacetate
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium	DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO: Dimetilsulfóxido	DMSO: Dimethyl sulfoxide
DOX: Doxorubicina	DOX: Doxorubicin
EFM: Eficacia para formar mamoesferas	MFE: Mammosphere Forming Efficacy
ERO: Especies Reactivas de Oxígeno	ROS: Reactive Oxygen Species
Actina-F: Filamentos de Actina	F-Actin: Actin Filaments
H: Heparina	H: Heparin
H-E: Hematoxilina-Eosina	H-E: Hematoxylin-Eosin
ICTF: Isocianato de Fluoresceína	FICT: Fluorescein Isothiocyanate
IM: Índice Mitótico	MI: Mitotic Index
MEB: Microscopio Electrónico de Barrido	SEM: Scanning Electron Microscopy
MET: Microscopio Electrónico de Transmisión	TEM: Transmission Electron Microscopy
MTs: Microtúbulos	MTs: Microtubules
MTT: Bromuro de Metiltiazolidifenil-tetrazlio	MTT: Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide
NPs: Nanopartículas	NPs: Nanoparticles
NPMs: Nanoparticles Magnéticas	MNPs: Magnetic Nanoparticles
PEG: Polietilenglicol	PEG: Polyethylene Glycol
pHEMA: Poli (2-hidroxietil metacrilato)	pHEMA: poly (2- hydroxyethyl methacrylate)
PVA: Polivinil Alcohol	PVA: Polyvinyl Alcohol

QDs: Quantums Dots	QDs: Quantums Dots
RM: Resonancia Magnética	MR: Magnetic Resonance
RMF: Resistencia a Multifármacos	MDR: Multidrug resistant
RMI: Resonancia Magnética por Imagen	MRI: Magnetic Resonance Imaging
RPA: Retención y Permeabilidad Aumentada	EPR: Enhanced Permeability and Retention
SFB: Suero Fetal Bovino	FBS: Fetal Bovine Serum
TC: Tomografía Computarizada	CT: Computed Tomography
TAC: Tomografía Axial Computarizada	CAT: Computed Axial Tomography
TFS: Tampón Fosfato Salino	PBS: Phosphate Buffered Saline

RESUMEN

ABSTRACT



Resumen

Actualmente, existe un continuo desarrollo de la síntesis de nanopartículas magnéticas con diferentes revestimientos y biocompatibles, para su posterior funcionalización con fármacos y/o anticuerpos específicos de células tumorales. De esta forma, las nanopartículas podrán ser usadas para mejorar los tratamientos contra el cáncer.

En el presente trabajo de investigación se han analizado en la línea celular de carcinoma de cérvix humano (HeLa) diferentes tipos de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro con cubiertas de distinta naturaleza: i) dextrano (D) con carga superficial neutra, que no fueron internalizadas ni a la mayor de las concentraciones; ii) heparina (H) cargadas negativamente, que mostraron entrada celular sólo a altas concentraciones e indujo alteraciones de los husos mitóticos y citotoxicidad; iii) ácido dimercaptosuccínico (DMSA) también con carga negativa; y iv) aminodextrano (AD) y aminopropilsilano (APS), ambas catiónicas, que demostraron una elevada capacidad para acumularse en las células sin ejercer efectos citotóxicos. Por razones obvias, las nanopartículas recubiertas de dextrano y de heparina fueron descartadas para posteriores estudios. Los resultados obtenidos han evidenciado que los tres últimos tipos de nanopartículas (DMSA, AD y APS) entraban y se acumulaban eficazmente en el interior celular y se podían visualizar en microscopía óptica. Con la tinción de azul de Prusia y la cuantificación de hierro intracelular (mediante el ensayo de la ferrocina), se detectó una mayor eficacia de internalización para las nanopartículas APS, en relación a las AD o DMSA. Asimismo, se ha demostrado que las nanopartículas se acumulaban en orgánulos ácidos por medio de la sonda fluorescente LysoTracker® Red DND-99 (microscopía óptica y confocal). Los estudios llevados a cabo en microscopía electrónica de transmisión evidenciaron que el mecanismo de entrada en las células se realizaba por endocitosis, concretamente macropinocitosis o endocitosis mediada por clatrina, dependiendo del tamaño de los agregados que formaban las nanopartículas.

Además, las tinciones de las células incubadas con nanopartículas con rojo neutro y Hoechst-33258, así como los estudios realizados al microscopio electrónico de barrido, mostraron que la acumulación de las diferentes nanopartículas, no alteraba la morfología celular. Estas nanopartículas tampoco indujeron alteraciones en el ciclo celular cuando se analizaron por citometría de flujo. Asimismo, el análisis de la distribución de los microtúbulos y los filamentos de actina (incluida la proteína vinculina), mediante técnicas de inmunofluorescencia o marcaje con faloidina-Alexa Fluor® 555, mostraron una morfología y distribución normales de estos componentes del citoesqueleto. En relación a la detección de estrés oxidativo, las diferentes nanopartículas no generaron especies reactivas de oxígeno en el interior de las células. Los resultados obtenidos mediante los ensayos de viabilidad (MTT y azul Tripán) confirmaron la biocompatibilidad de estas nanopartículas, en las condiciones experimentales ensayadas.

Las nanopartículas DMSA fueron seleccionadas para proseguir los estudios encaminados a su futura aplicación en el cáncer de mama. Para ello, se utilizaron cuatro líneas celulares de carcinoma de mama humano (con distinto perfil génico): MCF-7, MDA-MB-231, BT-474, SK-BR-3 y una la línea celular no tumoral de mama: MCF-10A. Los resultados obtenidos, evidenciaron una eficaz acumulación de estas nanopartículas en el interior de las células, largos períodos de persistencia y ausencia de citotoxicidad.

Posteriormente, las nanopartículas DMSA fueron funcionalizadas covalentemente con el fármaco quimioterapéutico doxorrubicina (DOX), usando tres enlaces diferentes con distintas sensibilidades: i) O-DOX sensible a un ambiente reductor, ii) M-DOX a pH y iii) I-DOX a ambos parámetros, para seleccionar el que fuera más eficaz. Los estudios para evaluar la eficacia del transporte y liberación de la DOX se llevaron a cabo en la línea celular MDA-MB-231. Los resultados obtenidos demostraron una elevada acumulación de las nanopartículas DMSA funcionalizadas en las células, así como una lenta eliminación de la DOX. Los efectos citotóxicos inducidos por la liberación de la DOX de las nanopartículas transportadoras, se manifestaban a las 72 h de finalizar la incubación con las mismas. Además, se detectó el desencadenamiento de un doble mecanismo de muerte: apoptosis (en pequeña proporción) y catástrofe mitótica (mayoritaria) cuando se empleaba la estrategia covalente O-DOX, M-DOX e I-DOX, obteniéndose un mayor porcentaje de apoptosis

usando el enlace I-DOX. Los resultados del ensayo de viabilidad del MTT demostraron que la inmovilización covalente con el enlace I-DOX, causaba la mayor toxicidad (60% de muerte celular). Mediante la técnica de inmunofluorescencia para α -tubulina y el marcaje de los filamentos de actina con faloidina-Alexa Fluor® 555, se observó que las células con morfología apoptótica carecían de ambos componentes del citoesqueleto.

Asimismo, se evaluó la eficacia de las nanopartículas DMSA transportando DOX (enlace I-DOX), para inactivar a las células madre tumorales presentes en los cultivos de células MDA-MB-231, mediante el ensayo de las mamoesferas. Los resultados obtenidos indicaron un menor número de mamoesferas (0.7%) con respecto al control (1%). Asimismo, el análisis de las secciones de las mamoesferas con distintas metodologías (tinción con hematoxilina-eosina y azul de Prusia, inmunofluorescencia indirecta para α -tubulina, citocromo C y caspasa-3 activa), indicaron que se había desencadenado una muerte celular por apoptosis en la mayoría de las células que formaban las mamoesferas. Resultados similares, en cuanto a la eficacia de formación de mamoesferas, se obtuvieron en los cultivos primarios procedentes de las muestras de una paciente con cáncer de mama, cuando se utilizó el enlace I-DOX unido a las nanopartículas DMSA.

Por otra parte, los estudios de simulación de hipertermia intracelular mediante calentamiento en un baño térmico (44 °C durante 1h) llevados a cabo en células HeLa, MCF-7, MDA-MB-231 y BT-474, evidenciaron que existía una diferente sensibilidad a la elevación de la temperatura, dependiendo de la línea celular, siendo las células BT-474 las más sensible y las células HeLa a las que menos les afectaba. Además, se comprobó que la inactivación de las células se producía al desencadenarse una muerte celular apoptótica.

En relación a los experimentos de hipertermia intracelular, tanto los ensayos con nanopartículas revestidas de aminodextrano (AD), como con las recubiertas de ácido dimercaptosuccínico (DMSA) en células HeLa, indicaron la capacidad de dichas nanopartículas para inducir una muerte celular por apoptosis, cuando se les aplicaba después de la incubación un campo magnético alterno externo. Resultados similares se obtuvieron en células MDA-MB-231 incubadas con las nanopartículas DMSA y expuestas a un campo magnético alterno.

En resumen, las nanopartículas de óxido de hierro revestidas de ácido dimercaptosuccínico (DMSA), reúnen excelentes propiedades para una posible aplicación en oncología, ya que al ser funcionalizadas covalentemente con el enlace I-DOX, pueden ser usadas como eficaces vehículos para el transporte y liberación de fármacos antitumorales, al poderse reducir la dosis del fármaco y eludir la resistencia a la quimioterapia (incluyendo su capacidad para actuar sobre las células madre tumorales). Asimismo, tanto las nanopartículas revestidas de aminodextrano (AD) como las de ácido dimercaptosuccínico (DMSA) pueden ser empleadas como agentes para inducir hipertermia intracelular.

Finalmente, también se llevaron a cabo diversos estudios con otros tipo de nanomateriales, en células HeLa, concretamente: i) nanopartículas de magnetita recubiertas de diferentes cationes y aluminio. Los resultados obtenidos demostraron que este tipo de nanomaterial, se acumulaba con gran eficacia en las células sin causar toxicidad, pudiendo tener una importante aplicación en el diagnóstico por resonancia magnética, al mejorar el contraste de la imagen entre el tejido normal y el patológico, y ii) nanocristales de óxido de hierro óxido recubiertos de bismuto y estabilizados en agua por polietilenglicol (PEG). Con este nanomaterial se obtenían imágenes con un mayor contraste por tomografía computarizada (TC usando rayos X), que por resonancia magnética.

Currently, magnetic nanoparticles with different biocompatible coating are being developed for subsequent functionalization with drugs or specific antibodies against tumour cells. Medical applications using magnetic nanoparticles might be a promising novel therapeutic approach, especially for cancer treatment.

In the present investigation, five types of magnetic iron oxide nanoparticles were analysed in the human cervical carcinoma cell line (HeLa), which differed in the type of coating: i) dextran (D) with neutral surface charge, which were not internalised even at the highest concentration; ii) heparin (H), negatively charged, which entered only at high concentrations and induced mitotic arrest and cytotoxicity; iii) dimercaptosuccinic acid-coated (DMSA), with negative charge too; and iv) aminodextran (AD) and aminopropylsilane (APS), both cationic, which entered inside cells showing no toxic effects. For obvious reasons, the dextran- and heparin-coated nanoparticles were discarded for further studies. The results have shown the last three types of nanoparticles (DMSA, AD and APS) entered and accumulated inside cells effectively, and besides, they can be detected in light microscopy. With Prussian blue staining and intracellular iron quantification (by ferrozine assay), higher accumulation of APS nanoparticles was found when compared to DMSA or AD nanoparticles. Moreover, their accumulation has been shown in acidic organelles by fluorescent LysoTracker® Red DND-99 probe (optical and confocal microscopy). Studies carried out in transmission electron microscopy shown that the mechanism of internalisation of these nanoparticles occurs by endocytosis, specifically macropinocytosis or clathrin-mediated endocytosis, depending on the size of the aggregates. Furthermore, neutral red and Hoechst-33258 stainings of cells incubated with nanoparticles, and studies performed in scanning electron microscopy, showed that accumulation of different nanoparticles does not affect cellular or nucleus morphology. These nanoparticles did not induce alterations in cell cycle when they were analysed by flow cytometry. Moreover, no differences were found when investigating microtubules or actin filaments (including vinculin protein), by either

immunofluorescence or staining with phalloidin-Alexa Fluor® 555, respectively. In relation to the detection of oxidative stress, the different types of nanoparticles did not generate reactive oxygen species inside cells. The results obtained by the viability assays (MTT and Trypan blue) confirmed biocompatibility of these nanoparticles in the experimental conditions tested.

The DMSA-coated nanoparticles were selected to continue studies directed to their future application in breast cancer. For this purpose, four human breast carcinoma cell lines (with different gene profiling): MCF-7, MDA-MB-231, BT-474 and SK-BR-3 and one human breast no carcinoma cell line: MCF-10A, were used. The results showed an effective accumulation of nanoparticles within cells, long duration and absence of cytotoxicity.

Subsequently, nanoparticles were functionalized covalently with the chemotherapeutic drug doxorubicin (DOX), using three different linkers with different sensibility: i) O-DOX, sensitive to reducing environment, ii) M-DOX, to pH and iii) I-DOX, to both parameters, to identify the best of them. Studies to evaluate transport and release efficiency of doxorubicin were carried out in MDA-MB-231 cells. The results obtained have shown that nanoparticles are efficiently accumulated inside cells, and conversely, very slowly expelled. The cytotoxic effects induced by the release of DOX were observed at 72 h post-incubation. Moreover, a dual mechanism of death: apoptosis (only a small proportion) and mitotic catastrophe (the vast majority of cases) was detected, obtaining higher percentage of apoptosis cell using the I-DOX strategy. Data of MTT viability assay showed that covalent immobilization with linker I-DOX caused the greatest toxicity (60% of cell death). Moreover, indirect immunofluorescence for α -tubulin and F-actin staining with phalloidin-Alexa Fluor® 555 showed that cells with apoptotic morphology did not have both cytoskeletal elements.

Additionally, the effectiveness of the DMSA-coated nanoparticles carrying DOX (linker I-DOX) to inactivate cancer stem cells present in the MDA-MB-231 cultures was evaluated by mammosphere formation assay. The obtained results showed a fewer number of mammospheres (0.7%) were formed compared to the control (1%). Likewise, mammospheres visualization in paraffin-embedded sections by different methodologies (hematoxylin-eosin and Prussian blue stainings, as well as, indirect immunofluorescence for α -tubulin, cytochrome C and active caspase-3) indicated that I-DOX had triggered cell death by apoptosis in the most of mammosphere-forming cells. Similar results,

about mammospheres forming efficiency, were obtained in primary cultures from a metastatic pleural effusion sample taken of a patient, when the linker I-DOX bound to DMSA-coated nanoparticles was used.

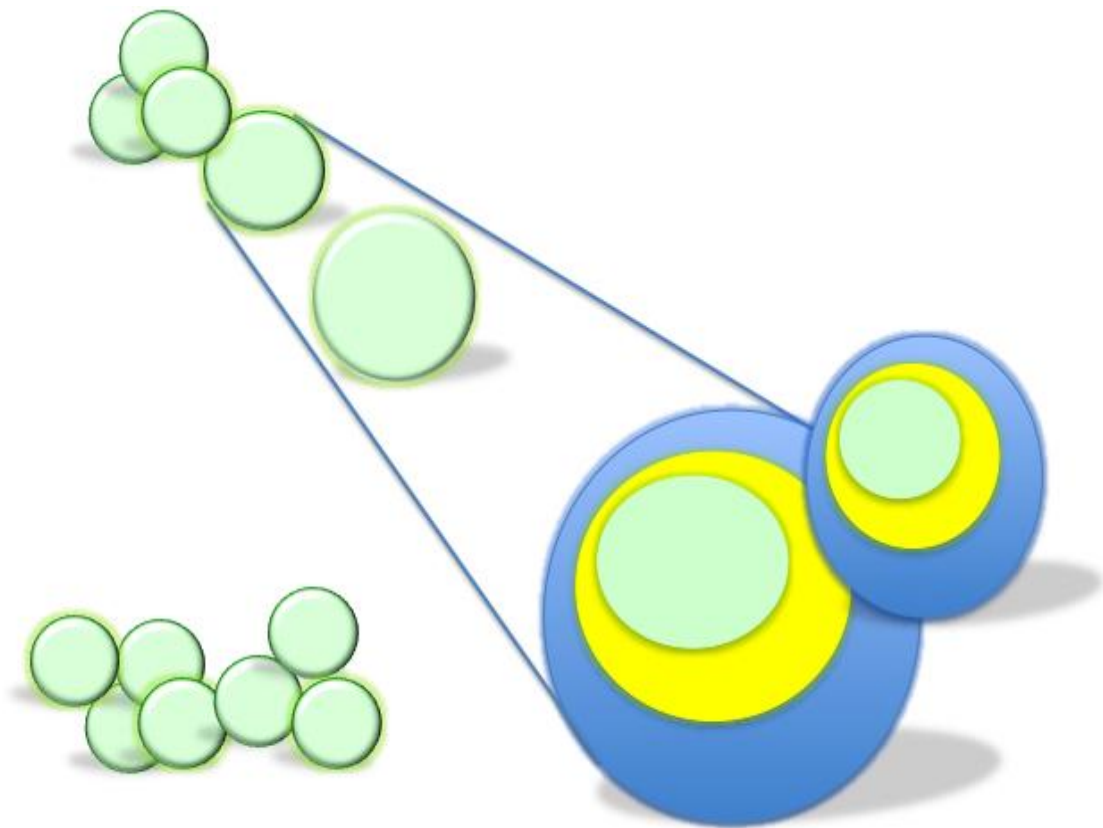
On the other hand, simulation studies of intracellular hyperthermia by heating in a thermal bath (44 ° C for 1h) conducted in HeLa, MCF-7, MDA-MB-231 and BT-474 cells, showed that there was a different sensibility to temperature rise depending on the cell line, being BT-474 the most sensitive cells and HeLa cells were less affected.

Regarding intracellular hyperthermia experiments, both trials with aminodextran (AD)- and dimercaptosuccinic acid (DMSA)-coated magnetic nanoparticles in HeLa cells, indicated the ability of these nanoparticles to induce cell death by apoptosis when an external alternating magnetic field was applied. Similar results were observed in MDA-MB-231 cells incubated with DMSA-coated nanoparticles and exposed to an alternating magnetic field.

In summary, dimercaptosuccinic acid-coated magnetic nanoparticles have excellent properties for potential applications in oncology, because of their covalent functionalization using the linker I-DOX. These nanoparticles could be used as carriers for the transport and release of anti-tumor drugs, to be able to reduce drug dose and circumvent some of the mechanisms that induce resistance to chemotherapy (including its ability to act on tumour stem cells). Also, both aminodextran (AD)- such as dimercaptosuccinic acid (DMSA)-coated magnetic nanoparticles could be employed as agents for inducing intracellular hyperthermia.

Finally, studies with other types of nanomaterials were carried out also in HeLa cells, particularly: i) Aluminium and different cationic-coated nanoparticles of magnetite. Results showed that this type of nanomaterial accumulated effectively in cells without causing toxicity and can have an important application in diagnosis by magnetic resonance imaging, to enhance the image contrast between the normal and pathological tissue, ii) bismuth-coated iron oxide nanocrystals stabilized in water by polyethylene glycol (PEG). With this nanomaterial were obtained images with higher contrast by computed tomography (using X-ray, CT), than using magnetic resonance.

INTRODUCCIÓN



1. Nanotecnología y Nanomedicina

La **Nanotecnología** se define como la ciencia del diseño, síntesis, caracterización y aplicación de materiales y dispositivos cuyo tamaño oscila entre 1 y 100 nm¹, por lo tanto a nivel de los átomos, las moléculas y las estructuras supramoleculares (ver *Figura 1*). En estas dimensiones, las propiedades de los materiales cambian drásticamente y permiten interacciones celulares y moleculares altamente específicas. Por ello, la Nanotecnología se ha convertido en un área estratégica de la investigación altamente competitiva, con un rápido crecimiento y un considerable potencial económico en diversos campos, incluyendo la electrónica y telecomunicaciones, medicina, biología, química, materiales, energía y medio ambiente. Asimismo, ha sido inevitable que la Nanotecnología se aplique en biotecnología, dando lugar al término Nanobiotecnología.

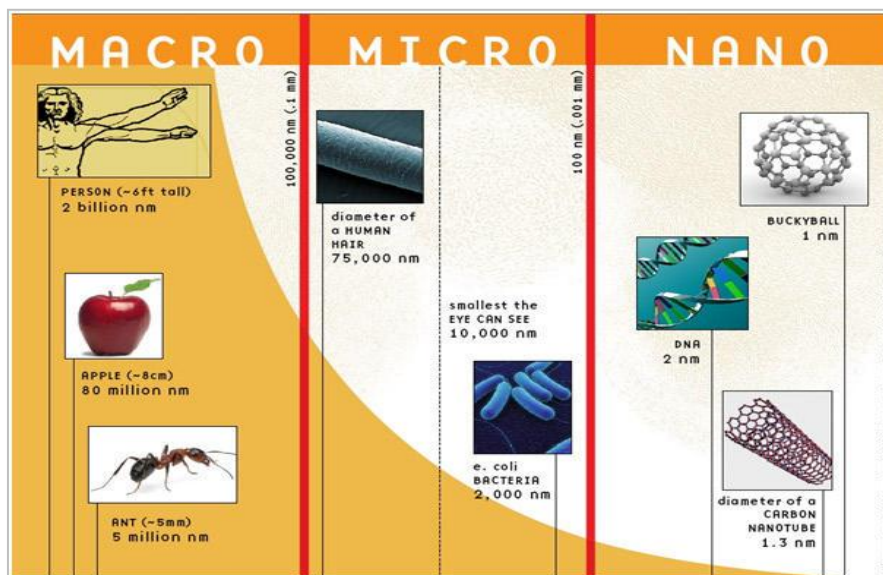


Figura 1.- Esquema de la escala macro, micro y nanométrica. Tomada de <http://www.engineersgarage.com/articles/what-is-nanotechnology-applications-future>.

El aspecto más interesante de la Nanotecnología no es sólo la posibilidad de trabajar con materiales de reducidas dimensiones, sino el cambio drástico que sufren las propiedades físicas (eléctricas, ópticas, magnéticas, mecánicas, etc.) y químicas de la materia, cuando se trabaja a esta escala, con independencia de su composición. La conductividad eléctrica, el color, la resistencia o la elasticidad, entre otras propiedades, se comportan de manera diferente a como lo hace el material volumétrico².

Debido a ello, ya existen muchas aplicaciones tecnológicas de los nanomateriales, pero es posiblemente en el campo de la biomedicina, donde están depositadas las mayores esperanzas. La irrupción de la Nanobiotecnología en las ciencias de la salud ha dado lugar a una nueva disciplina: la **Nanomedicina**. Esta nueva ciencia monitoriza, repara, construye y controla componentes y funciones biológicas del organismo mediante el uso de sistemas en la nanoescala. Las tres áreas principales que agrupa la Nanomedicina son: el nanodiagnóstico, la nanoterapia y la medicina regenerativa.

Históricamente, el primer científico que supo predecir el alcance de la Nanotecnología fue Richard Feynman en su conferencia de 1959 titulada: *“There is plenty of room at the botton”*, en la cual planteó la posibilidad de manipular materiales a escala atómica y molecular (ver Figura 2)³.

Sin embargo, el término Nanotecnología fue acuñado por el profesor Norio Taniguchi, de la Universidad de Ciencias de Tokio, que lo definió de la siguiente manera: “La Nanotecnología consiste principalmente en el tratamiento, la separación, la consolidación y la deformación de los materiales en átomos o moléculas”. La idea básica de esta definición se extendió y se exploró con mayor profundidad a lo largo de la década de los años 80, con el descubrimiento de los quatum's dots en 1981, seguido por el descubrimiento de los fulerenos en 1985 y la publicación en 1986 del libro de K. Eric Drexler: *Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology*. Todo ello, supuso el inicio de una intensa investigación basada en la Nanotecnología, que ha dado lugar a grandes avances.

Parte de estos avances están relacionados con el desarrollo de una gran cantidad de nanomateriales capaces de transportar agentes terapéuticos para el tratamiento de distintas enfermedades. Actualmente, muchos de los fármacos, incorporados en diferentes nanomateriales, ya han sido aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*). El Caelyx® y el Doxil® (liposomas que contienen el fármaco doxorubicina) fueron aprobados en 1995; el Abraxane® (nanopartículas con el fármaco paclitaxel) fue aprobado en 2005 para la terapia contra el cáncer; el Ambisome® para combatir enfermedades infecciosas, entre ellas el VIH, la malaria y las infecciones nosocomiales; el Cimzia® ha sido aprobado en 2008 para la enfermedad de Crohn y en 2009 para la artritis. Asimismo, los ácidos nucleicos también tienen un uso terapéutico, ya sean fragmentos de ADN para la terapia génica o pequeños fragmentos de ARN, tales como los siRNA (*small interfering RNA*)^{3,4}.

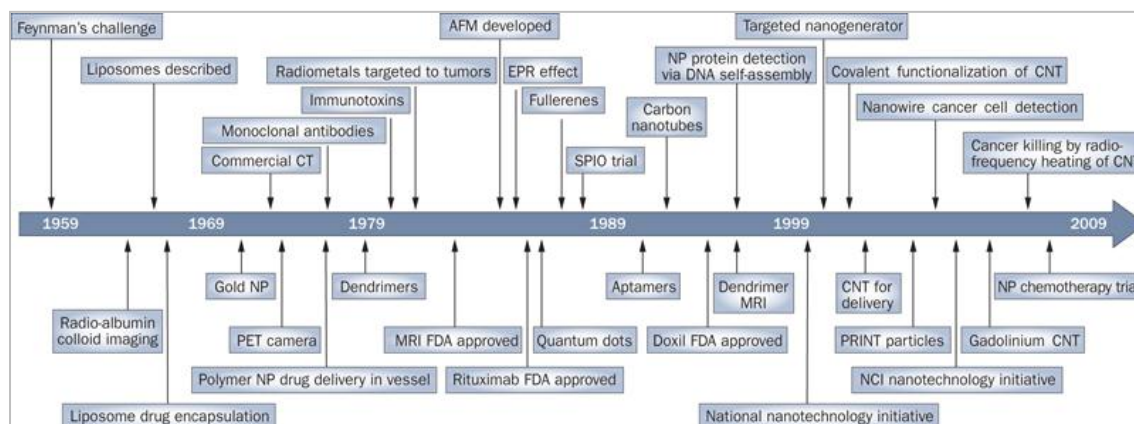


Figura 2.- Esquema representativo de la historia de la Nanotecnología y la Nanomedicina. Tomado de *Nat Rev Clin Oncol.* 7: 266-276 (2010).

2. Tipos de nanopartículas

Debido a las características tan excepcionales de los nanomateriales, han comenzado a utilizarse de modo habitual técnicas experimentales que permiten fabricarlos, caracterizarlos y manipularlos. Existen diferentes tipos de nanomateriales, y entre ellos, se encuentran las **nanopartículas (NPs)**. Las NPs se caracterizan por tener las tres dimensiones en el rango nanométrico. Pueden estar formadas por un único material o presentar composiciones más

complejas con recubrimientos de distinta naturaleza. Su diferente composición les confiere características específicas como: el tamaño, la forma, la rigidez, la carga, la conductividad, la porosidad y la compatibilidad con el organismo.

En general, el tipo de cubierta y la carga superficial juegan un papel importante en la biocompatibilidad de las NPs y en su internalización dentro de las células⁵. Debido a que la membrana plasmática está cargada negativamente, las NPs recubiertas de polímeros cargados positivamente, tienden a unirse de forma inespecífica a las membranas de las células y poseen menos tiempo de circulación en sangre, mientras que las NPs con carga negativa o sin carga tienen unos tiempos de circulación en sangre mucho mayores⁶⁻⁸.

El tamaño de las NPs puede afectar a su biodistribución, a la vía de entrada de las NPs en la célula y a su capacidad para extravasarse desde la sangre a los tejidos tumorales. El tamaño de las NPs debe ser suficientemente pequeño para evitar su captura por el sistema retículo-endotelial (< 200 nm), pero suficientemente grande para evadir la filtración directa por los riñones (> 5 nm). Por lo tanto, las NPs que oscilan entre 10 y 100 nm poseen el tamaño más adecuado para alcanzar una distribución óptima *in vivo*⁹.

Asimismo, la forma de las NPs es también un parámetro fundamental que requiere especial atención. La mayoría de las NPs sintetizadas para transportar fármacos antitumorales tienen una forma esférica, pero también han sido propuestos nanomateriales de forma cúbica, cilíndrica, elipsoidal y discoidal como nuevos transportadores de fármacos. Por otra parte, la rigidez también es un factor significativo que influye en el mecanismo de entrada de las NPs^{7,9}.

Otro aspecto a tener en cuenta es que las NPs interaccionan tanto entre ellas (tienden a agregarse), como con el medio que les rodea y con las células. La interacción entre las NPs y las proteínas del suero induce la formación de una “corona” de proteínas que recubre rápidamente la superficie de las NPs. Para disminuir estos efectos, se están usando diferentes estrategias de recubrimiento de la superficie de las mismas con polímeros como el polietilenglicol y el dextrano, entre otros¹⁰.

Actualmente, podemos encontrar una gran variedad de tipos de NPs (ver *Tabla 1* y *Figura 3*). Entre las más importantes destacan: los quantum dots, los dendrímeros, las nanopartículas magnéticas, las nanopartículas de oro, los nanotubos de carbono y los liposomas¹¹. A continuación se comentan brevemente las características de estos tipos de NPs.

Tabla 1.- Resumen de los principales tipos de nanopartículas. Tomada de *Target Oncol.* 4: 169-181 (2009).

Name	Size	Composition details
Quantum dots	2–10 nm	Colloidal fluorescent semiconductor nanocrystals. Central core consists of elements from groups II–VI of the periodic table
Dendrimers	<15 nm	Highly branched synthetic polymers with a layered architecture, consisting of a central core, an internal region and several terminal groups
Magnetic nanoparticles	10–20 nm	Spherical nanocrystals with Fe ²⁺ and Fe ³⁺ oxide core surrounded by dextran or PEG (polyethelene glycol) molecules, with agglomerates typically 30–150 nm in diameter
Gold nanoparticles	<50 nm	Can be prepared into different geometries: nanospheres, nanoshells, nanorods or nanocages
Carbon nanotubes	<100 nm	Coaxial graphite sheets
Liposomes	50–100 nm	Phospholipid vesicles. Classified by size and the number of layers: multi-, oligo- or uni-lamellar

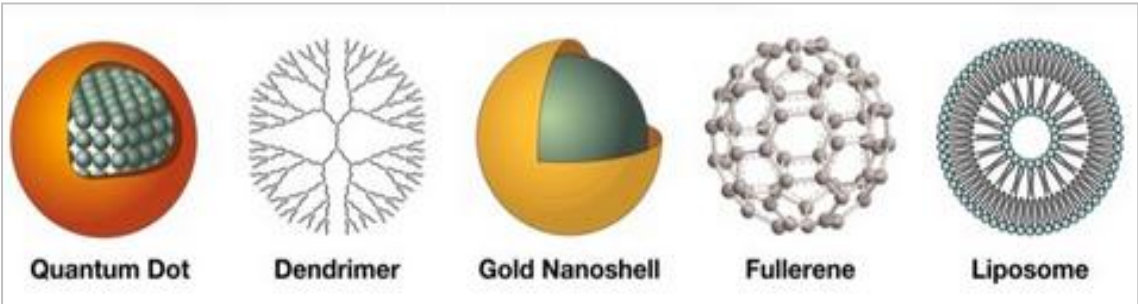


Figura 3.- Esquemas de los diferentes tipos de nanopartículas. Tomada de <https://ocg.cancer.gov/news-publications/e-newsletter-issue/issue-11>.

Los **Quantums Dots (QDs)** son partículas esféricas cristalinas semiconductoras cuyo diámetro es inferior a 10 nm, conteniendo aproximadamente de 200 a 1000 átomos. El núcleo está compuesto por elementos del grupo II-VI o del III-V de la tabla periódica. Las características ópticas de los QDs se ajustan mediante un espectro molecular de energía dependiente del tamaño de la partícula. Estas

partículas mejoran la señal de luminosidad hasta 100 veces comparada con proteínas o sondas orgánicas marcadas fluorescentemente^{12,13}.

Los **dendrimeros** son polímeros sintéticos de construcción arborescente. Están formados por un núcleo central, una región interna y numerosos grupos terminales que determinan las características de estos. Además, tienen un hueco interior capaz de albergar moléculas como por ejemplo fármacos^{13,14}.

Las **nanopartículas de oro** son resistentes a la corrosión, no son biodegradables y muestran baja toxicidad y flexibilidad conformacional. Estas partículas son muy versátiles y pueden ser preparadas con diferentes geometrías: esférica (nanospheres y nanoshells), alargada (nanorods) y cuadrada (nanocages). Asimismo, las NPs de oro con superficies catiónicas parecen ser más citotóxicas que las aniónicas, mientras que, las que tienen superficies neutras son las más biocompatibles¹³.

Entre las nanopartículas formadas por carbono, nos encontramos los **fulerenos**, formados por átomos de carbono. Tienen una forma esférica y son muy estables^{13,15}.

Los **liposomas** son estructuras auto-ensamblables y esféricas compuestas por una bicapa lipídica que rodea un espacio acuoso central. Se les denomina también vesículas fosfolipídicas. Su diámetro es variable. Se clasifican según el tamaño y el número de capas de fosfolípidos en: multilaminares, oligolaminares o unilaminares. Son usados para transportar fármacos en oncología^{13,16}.

Las nanopartículas magnéticas (NPMs) se comentan a continuación de forma más extensa, ya que han sido objeto de estudio en el presente trabajo de investigación.

Los materiales magnéticos se clasifican atendiendo a su comportamiento magnético en cinco categorías: diamagnéticos, paramagnéticos, ferromagnéticos, ferrimagnéticos y antiferromagnéticos. Los dos primeros tipos de materiales no presentan interacciones magnéticas colectivas y los momentos magnéticos no están ordenados, mientras que los tres últimos materiales muestran un ordenamiento de los momentos magnéticos, de forma paralela o antiparalela. Asimismo, los

materiales ferromagnéticos, ferrimagnéticos y antiferromagnéticos se pueden clasificar en función del tamaño en multidominios, monodominios y superparamagnéticos. Los materiales multidominios y monodominios tienen un tamaño entre 50 y 100 nm, mientras que los superparamagnéticos presentan un tamaño inferior a 50 nm¹⁷.

Las NPMs más utilizadas en la investigación para posibles aplicaciones biomédicas son las ferrimagnéticas con un tamaño < 50 nm, por lo que son superparamagnéticas. En sentido general, estas nanopartículas se componen de un núcleo magnético formado por óxido de hierro en forma de magnetita (Fe_3O_4) o maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)^{5,18,19} y, en la mayoría de los casos, una cubierta superficial modificada con determinados polímeros para aumentar la estabilidad y biocompatibilidad de éstas. Estos polímeros son biodegradables y pueden ser de diferente naturaleza (ver *Figura 4*)¹⁹: i) **naturales orgánicos**, como el dextrano, polisacárido complejo y ramificado formado por moléculas de glucosa y el quitosano, polisacárido lineal formado por unidades repetidas de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina; ii) **sintéticos orgánicos**, principalmente el polietilenglicol (PEG). La superficie de las NPs recubierta con PEG minimiza o elimina la absorción proteica a dicha superficie y como resultado pueden evadir las células del sistema retículoendotelial (por ejemplo los macrófagos del hígado y del bazo), aumentando el tiempo de circulación en la sangre⁵. También existen otros como el polivinil alcohol (PVA) que previene la coagulación y da como resultado partículas monodispersadas o el ácido poli-L-láctico (APL); y iii) **inorgánicos**, incluyendo metales, como el oro, y otros elementos, como el silicio y el carbono.

Además de por sus propiedades magnéticas, la utilidad de las NPs de óxido de hierro viene dada por su elevada biocompatibilidad y su fácil biodegradación en el organismo donde se han administrado. Después de ser metabolizadas, los iones de hierro de estas partículas son añadidos a los depósitos de hierro del organismo y a determinadas rutas metabólicas²⁰.

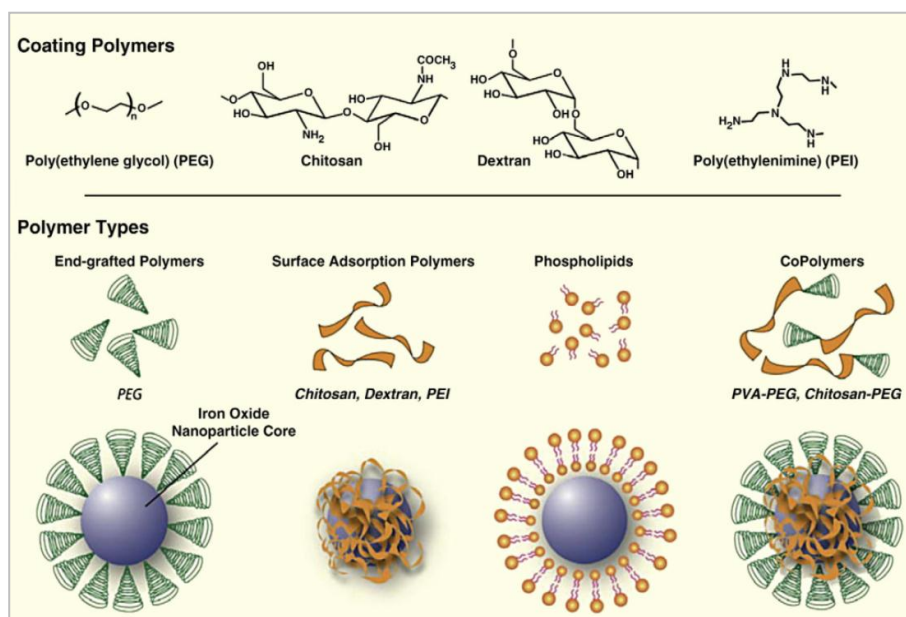


Figura 4.- Estructuras químicas del PEG, el quitosano, el dextrano y la polietilenimina. Tomadas de Adv Drug Deliv Rev. 62: 284-304 (2010).

Por otro lado, para conseguir un buen rendimiento de dichas NPMs en el diagnóstico y en la terapia, hay que lograr una unión lo más específica posible a determinadas “dianas” de interés biológico (células o tejidos del organismo). Para ello, es necesario funcionalizar la superficie de las NPMs con diferentes biomoléculas, como oligonucleótidos, aptámeros, péptidos o anticuerpos y marcadores tumorales, entre otros (ver Figura 5)^{21,22}. La biofuncionalización es por lo tanto, el proceso de conjugación química de los grupos funcionales de las NPMs con moléculas biológicas, dotándolas de una mayor especificidad y cuyo objetivo es lograr la acumulación de las NPMs en zonas específicas del organismo, al ser reconocidas por los ligandos biológicos unidos a ellas. Estos ligandos reconocen moléculas de afinidad expresadas o sobreexpresadas exclusivamente en un tipo determinado de células. De esta forma, se puede conseguir que se produzcan interacciones (receptor-ligando o antígeno-anticuerpo, por ejemplo) que sean de utilidad para marcar magnéticamente ciertos tipos de células, como por ejemplo las células tumorales²³. Asimismo, la NPMs puede también llevar incorporados fármacos o moléculas que sean capaces de actuar en las células diana. Este modelo ideal de NPs mono- o multifuncionalizadas, constituye una estrategia

eficaz para poder llegar y actuar en las células deseadas. En la actualidad, se están sintetizando NPMs con estas características para poder llegar y actuar en las tumorales tanto *in vitro* como *in vivo*²⁴.

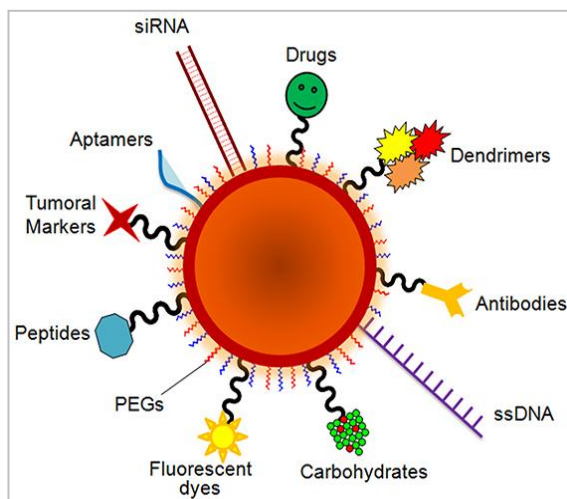


Figura 5.- Esquema representativo de una nanopartícula multifuncionalizada. Tomada de Front Chem. 2: 1-25 (2014).

En el presente estudio, se ha empleado principalmente un fármaco antitumoral: la doxorubicina (DOX), que se ha unido por medio de distintos tipos de enlaces covalentes a nanopartículas magnéticas revestidas de ácido dimercaptosuccínico (*dimercaptosuccinic acid*, DMSA).

La **doxorubicina** es un antibiótico de la familia de las antraciclinas, aislado de cultivos del *Streptomyces peucetius* variedad *caesius*. Actualmente, se prepara semisintéticamente a partir de la daunorubicina cuyo nombre comercial es adriamicina. Se utiliza habitualmente en el tratamiento de distintos tipos de cáncer, tanto de tumores sólidos (mama, ovario, pulmón, estómago, vejiga, entre otros) como de leucemias. La DOX ejerce su acción citotóxica mediante dos mecanismos: por un lado, inhibe a la enzima topoisomerasa II, implicada en la replicación y transcripción del ADN, y también producen roturas simples o dobles en el ADN, a través de alteraciones en aquellas reacciones mediadas por la topoisomerasa II. Además, la reducción de estos compuestos dentro de la célula, induce la formación de especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS). Las antraciclinas

también interactúan directamente con las membranas celulares y alteran sus funciones, lo cual pueden tener importancia en los efectos antitumorales^{25,26}. La administración de la DOX en los pacientes es intravenosa, se metaboliza en el hígado y no atraviesan la barrera hemato-encefálica. Si bien la toxicidad hematológica en forma de mielosupresión, especialmente leucopenia, limita frecuentemente en términos de dosis/tiempo la administración de los ciclos de quimioterapia, la DOX también induce una toxicidad cardíaca en el paciente, que limita la dosis total a administrar. Estudios recientes indican que esta cardiotoxicidad está producida por los efectos de la DOX sobre el ADN mitocondrial, que codifica para un pequeño número de proteínas que son críticas para la fosforilación oxidativa, y los ARN que componen los ribosomas mitocondriales. Todas las demás proteínas destinadas a la mitocondria son codificadas por el genoma celular, como las topoisomerasas 1A, 1B y 2 β ²⁵.

3. Mecanismos de entrada de las nanopartículas

La membrana plasmática es una estructura que forma una barrera física hidrofóbica, delimitando el contenido celular. Está formada por una bicapa lipídica compuesta por lípidos, principalmente fosfolípidos y colesterol, por proteínas, y en menor proporción, por glúcidos. Su composición no es estática, sino que está en permanente renovación en respuesta a las señales extra e intracelulares que le permiten su adaptación en función de las necesidades fisiológicas de la célula.

Aunque su principal función es mantener el equilibrio entre el medio intracelular y el medio extracelular, la membrana plasmática también se encarga de la señalización celular gracias a los receptores que se localizan en su membrana, de la adhesión célula-célula o célula-matriz extracelular y de regular la entrada y salida de muchas sustancias, actuando como una barrera selectiva frente a determinadas moléculas.

Los mecanismos de transporte presentes en la membrana plasmática son diversos y dependen de la molécula a transportar. Por ello, en este apartado sólo nos vamos a centrar en los mecanismos de transporte para macromoléculas, ya que ha sido objeto de estudio en este trabajo.

La incorporación de macromoléculas al interior celular se realiza por un mecanismo conocido como endocitosis, en el cual las macromoléculas son englobadas en invaginaciones de la membrana plasmática que acaban depreniéndose de la misma, quedando las macromoléculas contenidas en el interior de una vesícula en el citoplasma. Las principales rutas endocíticas (ver *Tabla 2* y *Figura 6*)²⁷ son: i) la **fagocitosis**, es típica de células fagocíticas, como los macrófagos. Se produce por la emisión de pseudópodos alrededor de la partícula o microorganismo hasta englobarla completamente en el interior celular en una vesícula, llamada fagosoma; y ii) la **pinocitosis**, si la entrada de las macromoléculas se lleva a cabo por alguna de estas rutas: **macropinocitosis**, proceso mediante el cual en la superficie celular se crean evaginaciones a modo de “ola” cuyo frente acaba entrando en contacto con la membrana plasmática con la que se fusiona, dando lugar a una gran vesícula interna o macropinosoma, que posteriormente se fusiona con endosomas tempranos; **endocitosis mediada por clatrina**, tiene lugar por pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática que se forman en áreas donde se encuentra la proteína clatrina que terminan en la formación de una vesícula. Una vez que la vesícula se ha cerrado e internalizado, la clatrina se desensambla y la vesícula puede ir a orgánulos específicos dentro de la célula, normalmente endosomas tempranos; y **endocitosis mediada por caveolinas**, se forman unas pequeñas invaginaciones en la membrana plasmática caracterizadas por poseer la proteína caveolina. Cuando se internalizan desde la membrana plasmática, forman unas vesículas (caveosomas) que pueden fusionarse con los endosomas tempranos.

Tabla 2.- Breve descripción de las principales vías endocíticas. Tomada de Small 6: 12-21 (2010).

Type of endocytosis	Brief description	Size of vesicle formed
1) Phagocytosis	Internalization of solid particles such as bacteria and yeast by specialized cells.	Dependent on the particles being engulfed. (Below)
2) Pinocytosis	Fluid-phase uptake of extracellular molecules. Multiple pinocytic pathways are possible (below).	
3) Macropinocytosis	Trapping of large fluid pockets by formation and enclosure of membrane protrusions.	>1 μm
4) Clathrin-mediated endocytosis	Concentration of transmembrane receptors and bound ligands in “coated pits” on the plasma membrane formed by the assembly of cytosolic proteins, the main assembly unit being clathrin.	$\approx 120\text{ nm}$
5) Caveolae-mediated endocytosis	Flask-shaped invaginations in the plasma membrane that mediate uptake of extracellular molecules into the cell by specific receptor binding.	$\approx 50\text{--}60\text{ nm}$

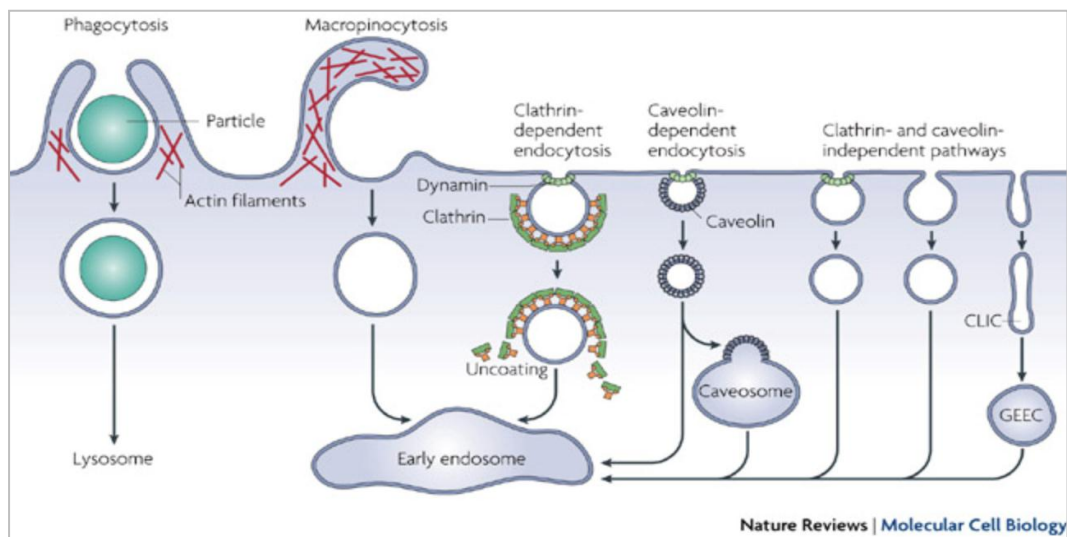


Figura 6.- Imagen de las principales vías endocíticas. Tomada de Nat Rev Mol Cell Biol. 8: 603-612 (2007).

Cualquiera que sea la ruta de endocitosis, las vesículas formadas en la membrana plasmática se liberan al citoplasma y se fusionan con unos orgánulos denominados endosomas. Los endosomas tempranos son orgánulos celulares donde convergen las vesículas que provienen del aparato de Golgi y, sobre todo, las que provienen de la membrana plasmática vía endocitosis. Desde estos endosomas tempranos se forman unas vesículas que se dirigen hacia la membrana plasmática y hacia el aparato de Golgi llevando, principalmente, membranas y receptores transmembrana, mientras que el resto de las moléculas sigue su procesamiento en los endosomas tardíos, que reciben las hidrolasas desde el aparato de Golgi, y posteriormente las macromoléculas se degradan en los lisosomas. Los lisosomas se caracterizan por ser los orgánulos donde se produce la degradación de las moléculas, llevadas a cabo por unas enzimas denominadas hidrolasas ácidas que poseen una elevada actividad a pH ácido. De manera que, todos los tipos de endosomas descritos son sólo estados de un proceso continuo de maduración²⁸.

La entrada de nanomateriales en el interior de las células depende de su estructura, de las características físico-químicas de éstos (tamaño, forma, carga, etc.) y de las interacciones

bioespecíficas entre su superficie de revestimiento con la célula (ver *Figura 7*)^{7,29}. Las NPs cargadas positivamente muestran una internalización más rápida y una mayor acumulación, mientras que las cargadas negativamente la velocidad de entrada y el grado de acumulación es menor. Algunas NPs catiónicas, como las metálicas, los QDs y los dendrímeros, son capaces de traspasar la membrana celular formando poros, por lo que se puede producir un desequilibrio en la concentración de iones, proteínas y otras moléculas entre el medio intracelular y extracelular²⁷.

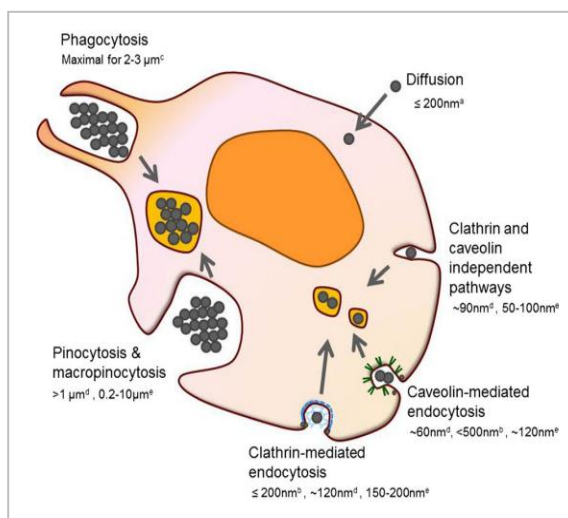
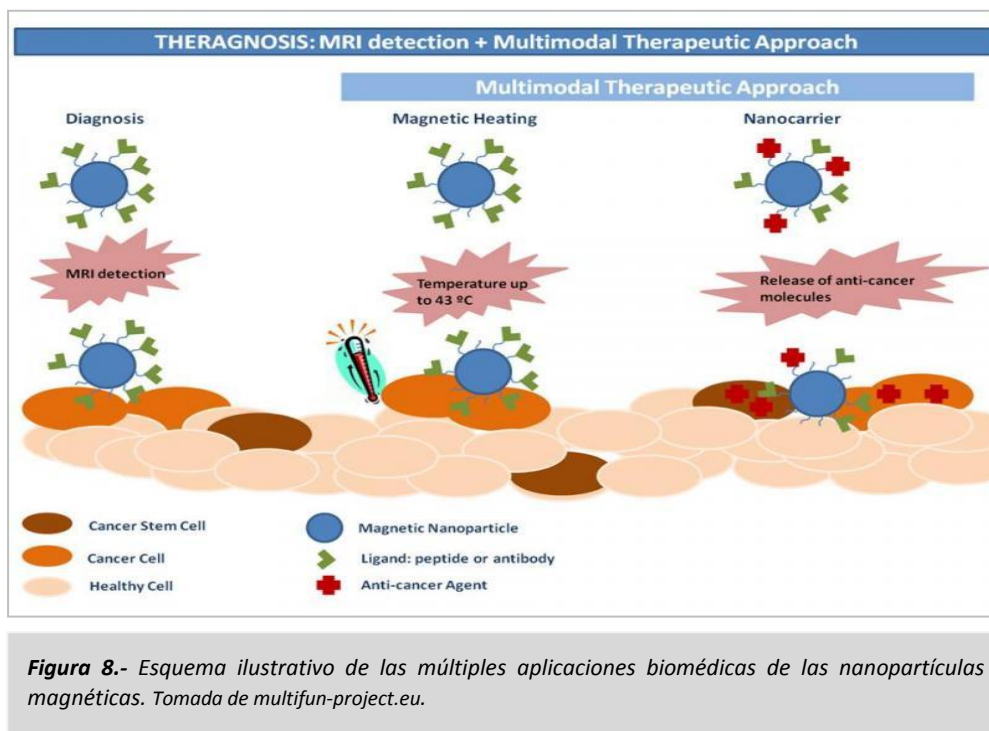


Figura 7.- Imagen de las principales vías de entrada de las NPs. Tomada de Arch Toxicol. 89: 659-675 (2015).

4. Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas magnéticas

Las nanopartículas magnéticas han despertado en los últimos años un creciente interés, debido a la gran variedad de aplicaciones que pueden llegar a tener en el ámbito de la biomedicina. Pueden ser empleadas en el diagnóstico como agentes de contraste en las imágenes de resonancia magnética (*Magnetic Resonance Imaging*, MRI) y en el ámbito de la terapia, como agentes terapéuticos para producir muerte celular mediante hipertermia en respuesta a la aplicación de un campo magnético alterno externo y transportar drogas farmacológicas a zonas específicas del organismo. Gracias al núcleo magnético de las NPs, éstas puedan ser dirigidas hacia zonas de interés específicas (ver *Figura 8*)⁵. Una vez situadas allí, las NPMs son capaces de liberar de forma localizada drogas terapéuticas con las que previamente han sido cargadas, evitando los potenciales efectos secundarios que puedan tener estos fármacos en el organismo, cuando se administran de forma

sistémica. Para conseguir la especificidad en su acción, las NPMs deben estar biofuncionalizadas, como ya se ha comentado anteriormente^{21,30,31}.



Por tanto, las NPMs poseen un amplio espectro de aplicaciones tanto en el campo del diagnóstico como en el tratamiento de patologías tan diferentes como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y las enfermedades neurodegenerativas³². Asimismo, el revolucionario concepto de agente teragnóstico (diagnóstico + terapia), puede permitir la detección precoz de las enfermedades, la monitorización simultánea de éstas mediante la obtención de imágenes ultrasensibles, y el tratamiento “dirigido” para conseguir una toxicidad mínima. Por todo ello, las NPMs se proponen como un material sumamente eficaz en el diagnóstico y el tratamiento simultáneo de patologías de elevada mortalidad, como el cáncer³³.

4.1. NPMs como agentes de diagnóstico

El cáncer es la principal causa de muerte, con millones de nuevas personas diagnosticadas cada año. Entre los diferentes tipos de cánceres, el cáncer de mama es el segundo tipo más común en todo el mundo en mujeres, representando casi el 23% del total de neoplasias diagnosticadas y el 14% de las muertes por cáncer^{34,35}.

En relación al diagnóstico, la imagen obtenida por resonancia magnética (RM) es una de las técnicas más utilizadas en la actualidad, ya que es sensible y no invasiva. Esta técnica no utiliza radiación ionizante, sino campos magnéticos para alinear los momentos magnéticos nucleares de los átomos de hidrógeno del agua en el cuerpo. De este modo, se pueden diferenciar unos órganos de otros, o los tejidos normales de los patológicos, en base a las propiedades de relajación de los átomos de hidrógeno del agua, en función de la distinta proporción de agua de los diferentes órganos (ver *Figura 9*). El empleo de los agentes de contraste para MRI, permite una mejor interpretación y caracterización de las lesiones, al aumentar la intensidad de la señal de tejidos diana cuando se compara con los tejidos sanos de alrededor⁵.

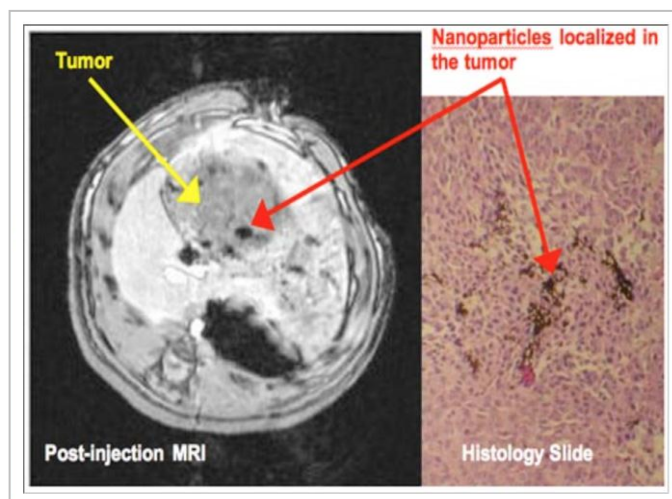


Figura 9.- Imagen de MRI y un corte histológico que muestra la localización de las NPs en un tumor de hígado. Tomada de *Nanotechnology* 20: 305101 (2009).

Los agentes de contraste utilizados para la obtención de imágenes mediante resonancia magnética, deben ser compuestos que presenten ciertas propiedades magnéticas y que no sean

tóxicos, pero también deben ser lo suficientemente pequeños (desde unos pocos átomos a nm) para poder ser administrados, absorbidos y excretados sin riesgo para el organismo. Los complejos de gadolinio son los agentes de contraste que de forma rutinaria más se utilizan, para aumentar el contraste, al distribuirse en el espacio intravascular e intersticial de los compartimentos fluidos de los órganos que se quieren visualizar.

Actualmente, las nanopartículas están demostrando ser una buena alternativa para reemplazar a los complejos de gadolinio^{24,36,37} debido a que producen un mayor contraste de estas imágenes y no son tóxicas³⁸. Su aplicación depende del tamaño de las nanopartículas. Las partículas con un diámetro inferior o igual a 50 nm son capturados principalmente por el sistema retículo-endotelial, una vez inyectadas en el organismo, lo que las hace muy idóneas para obtener imágenes del hígado o el bazo³⁹.

Gracias a estas propiedades, ya existen en el mercado NPMs de óxido de hierro como agentes de contraste (Endorem®, Sinerem®, Resovist®, Supravist®, Clariscan®, Abdoscan®) para las resonancias magnéticas de distintos órganos⁴.

4.2. NPMs como agentes terapéuticos: hipertermia

La hipertermia está siendo utilizada en oncología como un procedimiento terapéutico desde 1960. Se basa en la elevación de la temperatura de la región del cuerpo afectada por un proceso tumoral⁴⁰. Las principales barreras para su aplicación clínica son de tipo técnico ya que en los tumores profundos, es necesario que se genere el suficiente calor -de forma selectiva- para aumentar la temperatura local del tumor, sin sobrecalentar y dañar el tejido normal⁴¹.

En este tipo de terapia tienen un papel fundamental las NPMs, ya que una vez que han alcanzado su destino *in vivo*, mediante el efecto de permeabilidad y retención aumentada (*Enhanced Permeability and Retention*, EPR) y/o con la ayuda de un campo magnético externo, pueden calentarse mediante la aplicación de campos magnéticos alternos externos, aumentando la temperatura en la zona tumoral donde se acumulan, logrando así, la regresión tumoral. La capacidad de calentamiento que tienen las NPMs está definida por el rango de absorción específico, el cual mide la energía convertida en calor por unidad de masa.

Asimismo, para lograr una regresión completa del tumor, la temperatura intracelular generada debe superar los 43 °C (hipertemia intracelular o magnética). Las células dañadas resultantes son mayoritariamente las cancerígenas y no las sanas. Esta propiedad se debe a que la elevación de la temperatura, en los niveles descritos, resulta especialmente perjudicial para aquellas células que son hipóxicas y que tienen un pH bajo, que son precisamente las células tumorales donde se han acumulado las NPMs^{5,42,43}. Existe una técnica alternativa, denominada termoablación tumoral magnética, en la que se alcanzan temperaturas de hasta 55 °C⁴³. Es un método prometedor, pero su aplicación está siendo limitada, porque puede producir daños importantes en el tejido sano adyacente.

En comparación con las terapias tradicionales del cáncer (quimioterapia o radioterapia), la hipertermia en general y los tratamientos hipotérmicos intracelulares en particular, pueden reducir los importantes efectos secundarios causados en los tejidos sanos del paciente.

Asimismo, se ha observado que la hipertermia es de gran utilidad cuando se combina con la quimioterapia o la radioterapia. La hipertermia puede hacer que algunas células tumorales sean más sensibles a la radiación o dañar a otras células cancerígenas, que la radioterapia no puede dañar y también puede aumentar los efectos de ciertos medicamentos contra el cáncer⁴³. En la actualidad, se han obtenido resultados muy prometedores en animales de experimentación^{44,45} y en humanos en el tratamiento de muchas formas de cáncer, incluyendo el sarcoma, el melanoma, y cánceres de cerebro, pulmón, esófago, mama, vejiga, recto, hígado y cérvix. Aunque muchos de estudios han mostrado una reducción significativa en el tamaño del tumor, no siempre se ha demostrado una mayor supervivencia de los pacientes que recibieron los tratamientos combinados⁴⁶⁻⁴⁹.

Por todo ello, las NPMs se pueden considerar como unas herramientas muy prometedoras para la eliminación no invasiva de pequeños tumores utilizando calor inducido magnéticamente. En la actualidad, ya existe una empresa alemana, Magforce (<http://www.magforce.de/home.html>), que realiza este tipo tratamiento basado en la generación de calor en los tumores de los pacientes con cáncer. Esta terapia, que han denominado NanoTherm™ implica la administración intratumoral de nanopartículas magnéticas (de óxido de hierro con un recubrimiento de aminosilano). Posteriormente, se aplica un campo magnético alterno que calienta las nanopartículas. Dependiendo

de la duración del tratamiento y las temperaturas alcanzadas dentro del tumor, las células tumorales son irreversiblemente dañadas o sensibilizadas para una quimioterapia o radioterapia adicional.

4.3. NPMs como agentes terapéuticos: Liberación de fármacos

Una de las aplicaciones de las NPMs que más se está analizando actualmente es su empleo como **agentes transportadores de fármacos quimioterapéuticos**. No obstante, para que las NPs se consideren vehículos eficaces, deben cumplir los siguientes requisitos³¹:

- Ser capaces de unirse o contener el fármaco o fármacos deseados.
- Permanecer unidas de forma estable al fármaco en la sangre para evitar la distribución sistémica del fármaco.
- Acumularse en las células tumorales, reduciendo de este modo las complicaciones derivadas de la entrega inespecífica.
- Ser capaces de liberar el fármaco una vez localizadas en el tumor.
- Estar sintetizadas con un material biocompatible y con una vida útil limitada, para permitir la degradación segura de sus componentes.

En la actualidad, existen una gran cantidad de fármacos antitumorales utilizados en quimioterapia, que se podrían incorporar en NPMs para dirigirlos a la zona tumoral. En el capítulo 7 del libro *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*, se recoge una revisión detallada de los diferentes tipos de NPMs de óxido de hierro y los distintos fármacos que pueden llevar unidos en su superficie⁴³.

En relación a la estructura y células que forman un tumor, se puede comentar que la proliferación de las células cancerígenas requiere un suplemento continuo de oxígeno y nutrientes, por lo que los tumores forman una profusa red vascular para su rápido crecimiento, mientras que las regiones del tumor que reciben menor aporte sanguíneo, se vuelven necróticas. El proceso por el que se forman nuevos vasos sanguíneos en el tumor se denomina angiogénesis. Esos vasos sanguíneos están formados por células endoteliales que se disponen irregularmente y los espacios entre ellas son mucho mayores (100 nm - 2 μ m) que los de la vasculatura de los tejidos sanos (2 - 6 nm), debido

a la angiogénesis acelerada. Además, el tejido tumoral carece de un sistema de drenaje linfático funcional. Estas características, favorece la extravasación y la acumulación de NPs, de tamaños en el rango de 10 a 100 nm en las zonas tumorales^{31,50,51}. Este fenómeno se conoce como efecto de permeabilidad y retención aumentada (ver *Figura 10*). Esta es una forma pasiva de dirigir las NPMs al tumor que se denomina vectorización pasiva⁵²⁻⁵⁴. De forma paralela, se puede llevar a cabo una vectorización activa, conjugando en la superficie de la nanopartícula, biomoléculas que interacciones con receptores que se sobreexpresan en las células cancerígenas para dirigir las de una forma específica a la zona tumoral^{21,22}. La vectorización activa se hace especialmente necesaria en tumores metastásicos pequeños ($< 100 \text{ mm}^3$), ya que están poco vascularizados y las nanopartículas no pueden acceder mediante el efecto EPR⁵².

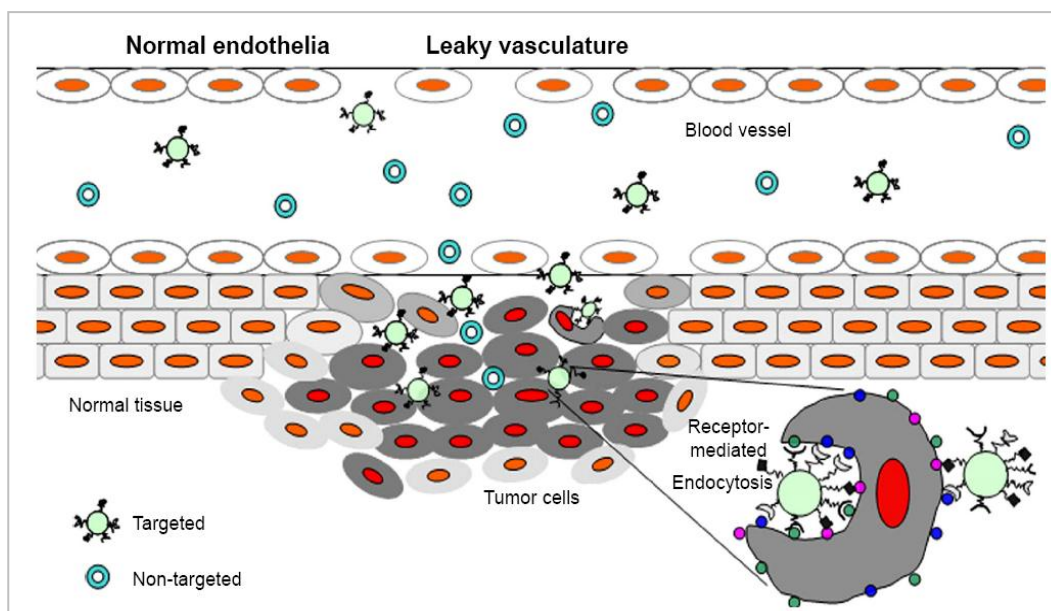


Figura 10.- Representación esquemática del efecto de permeabilidad y retención aumentada. Tomada de *Int J Nanomedicine* 10: 1399-1414 (2015).

Otro mecanismo efectivo para dirigir las nanopartículas magnéticas hacia órganos diana, se basa en la utilización de un campo magnético externo. Esta propiedad tiene un gran interés biomédico ya que permite el control de la acumulación de las NPMs de forma no invasiva^{19,55}.

Todos estos sistemas de direccionamiento, o incluso la combinación de varios de ellos, favorecen la acumulación de las NPMs en el área tumoral. De esta forma, la liberación de los fármacos terapéuticos se produce fundamentalmente en el tumor y se puede reducir la dosis del fármaco, disminuyendo los efectos secundarios no deseados sobre otras células o tejidos sanos⁵⁶. Para que se produzca la liberación de los fármacos, las NPMs tienen que ser internalizadas por las células diana sobre las que tienen que actuar y una vez en su interior deben liberar el agente terapéutico. Para ello, se incorporan sensores moleculares a las nanopartículas que son capaces de responder a diferentes estímulos químicos o biológicos como cambios en el pH, cambios en el potencial redox o actividades enzimáticas^{5,19,56,57}.

Por otra parte, es interesante destacar, que la eficacia de la quimioterapia está limitada por la resistencia que desarrollan las células tumorales a los fármacos (**quimiorresistencia**), expresando el fenotipo de resistencia a multidrogas (*Multi Drug Resistant*, MDR). Debido a ello, se produce: i) una mayor desintoxicación de los fármacos debido a una sobreexpresión de los transportadores de fármacos (bombas de eflujo) (ver *Figura 11*), tales como la glicoproteína-P, las proteínas asociadas a la resistencia a múltiples fármacos (MRP1, MRP2), y a la resistencia del cáncer de mama (BCRP), ii) una disminución en la entrada de los fármacos al interior celular, iii) una alteración de los receptores superficiales, iv) una mayor capacidad de reparación de los daños en el ADN, y v) alteraciones en la vía intrínseca de desencadenamiento de la apoptosis.

Para conseguir aumentar la cantidad de fármaco que se acumula en el interior celular y, por lo tanto, mejorar la eficacia del tratamiento se han propuesto varias estrategias⁵⁸:

- Superar la MDR en las células tumorales mediante: i) la modificación en los regímenes quimioterapéuticos; ii) el empleo de anticuerpos monoclonales contra la glicoproteína-P; iii) el desarrollo de nuevos fármacos que no sean sustrato de la glicoproteína-P; y iv) utilizar inhibidores para los transportadores ABC (bombas de eflujo).
- Utilizar nanomateriales como un sistema para el transporte y liberación de fármacos, como por ejemplo NPs poliméricas, NPs lipídicas sólidas, dendrímeros, liposomas, micelas y QD, entre otros.

- Emplear nanomateriales que inhiban la MDR basada en la expulsión de los fármacos al exterior celular mediante: i) el silenciamiento de los genes de resistencia a fármacos; y ii) la inhibición de las proteínas de resistencia a fármacos.
- Usar nanomateriales que supriman la evasión de la apoptosis que desarrollan las células tumorales, por ejemplo mediante el silenciamiento de la expresión de los genes antiapoptóticos como Bcl-2.
- Aplicar de forma combinada diferentes terapias para la liberación de los fármacos, como la terapia térmica, la terapia mediante ultrasonidos o la terapia fotodinámica.

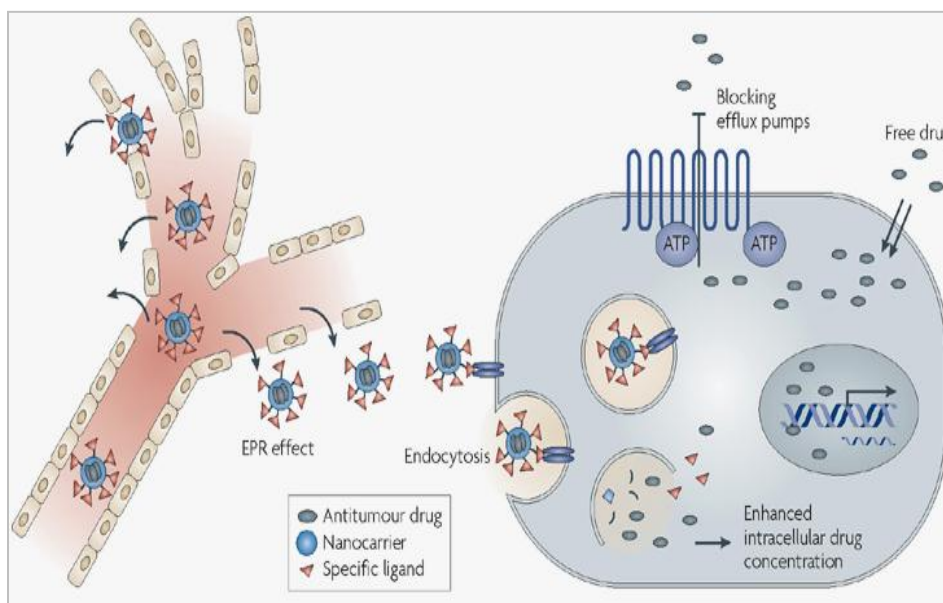


Figura 11.- Las células tumorales sobreexpresan transportadores de membrana implicados en la MDR (tipo ABC). Las nanopartículas, que llegan al tumor por efecto EPR, son capaces de evadir la MDR al no ser sustrato de dichos transportadores. Tomada de *Nat Rev Drug Discov.* 7: 771-782 (2008).

5. Nanotoxicidad

Cada vez se están diseñando mayores cantidades de nanopartículas para muy diversas aplicaciones industriales y productos de consumo. No obstante, se sabe que la exposición a ciertos

tipos de partículas puede causar graves efectos sobre la salud. Así pues, resulta esencial comprobar si la exposición a ciertas NPs induce riesgos para la salud de los trabajadores y de los consumidores. Si estos riesgos no se evalúan y controlan debidamente, pueden tener graves consecuencias para la salud humana y medioambiental⁵⁹.

Los posibles mecanismos de toxicidad inducidos por la exposición a las partículas en el ser humano son muy complejos y dependen de: la vía de exposición, la dosis, la respuesta del organismo, la susceptibilidad y las propiedades fisicoquímicas específicas de las partículas, como muestra la revisión efectuada por Hoet y *col.*⁶⁰. La absorción de NPs puede producirse a través de los pulmones, de la piel o del intestino, pero su desplazamiento hacia otros órganos plantea la posibilidad de que actúen distintos mecanismos de toxicidad en función del órgano de destino (*Figura 12*). Las propiedades de oxidoreducción en los distintos tejidos del organismo son diferentes. Pueden ser, desde muy oxidantes, como sucede en la piel o en los pulmones, hasta muy reductoras, como en el intestino, y esto puede afectar a los mecanismos que desencadenan el estrés oxidativo. Por lo cual, es necesario estudiar todos los sistemas del organismo a los que puedan llegar las NPs⁶¹.

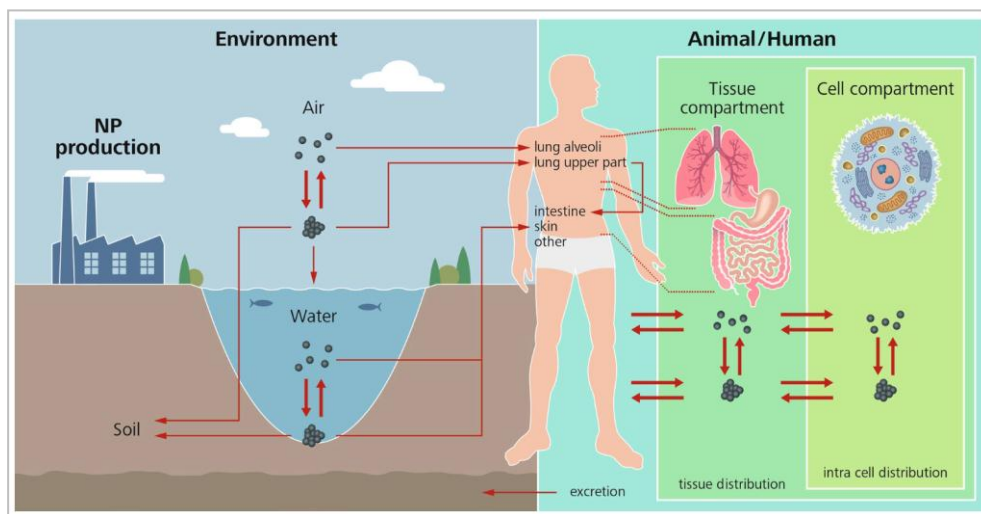


Figura 12.- Esquema de las diferentes vías de entrada de las partículas al organismo y su distribución tisular. Tomada de Arch Toxicol. 89: 659-675 (2015).

Por todo lo comentado anteriormente, ha surgido una nueva ciencia que se encarga del estudio de la toxicidad de los nanomateriales, la **Nanotoxicología**, que tiene como objetivo determinar si los nanomateriales son perjudiciales y en qué medida pueden ser una amenaza para el medio ambiente y para los seres humanos. Al tratarse de una ciencia relativamente joven, es necesario estandarizar los resultados de toxicidad y eficacia obtenidos por los diferentes grupos de investigación y establecer rangos objetivos para determinar la presencia o ausencia de efectos adversos^{62,63}. Los términos: estrés oxidativo, daño oxidativo, generación de radicales libres y antioxidación intracelular, se han convertido en parte de la terminología habitual dentro de la Nanotoxicología.

En términos químicos, las moléculas, incluyendo el oxígeno, pueden aceptar electrones y son, por lo tanto, agentes oxidantes. Estos procesos, llamados reacciones redox, son la base fundamental de un sin número de rutas bioquímicas y respuestas celulares. Un antioxidante (o agente reductor) se pueden clasificar como cualquier sustancia que es capaz de prevenir el daño oxidativo biológico. En cualquier organismo hay un mantenimiento continuo del equilibrio entre los oxidantes y los antioxidantes, que está estrechamente regulado y es crucial para la homeostasis y la función celular. El mantenimiento de este equilibrio se refiere como el potencial redox. El desequilibrio de la balanza hacia los prooxidantes se denomina estrés oxidativo y puede potencialmente conducir a un daño oxidativo de las biomoléculas. Del mismo modo, un aumento en antioxidantes puede dañar también las células, mediante el estrés reductor.

En relación al uso de los nanomateriales en cultivos celulares, es necesario destacar que la citotoxicidad depende en gran medida de la concentración utilizada de nanopartículas y del nivel de exposición al agente durante el contacto celular. Por tanto, los estudios *in vitro* son absolutamente necesarios antes de pasar a los estudios *in vivo*, pero no son suficientes para analizar con total certeza los posibles efectos adversos producidos por estos nuevos materiales¹¹.

En los estudios *in vitro*, uno de los mecanismos de nanotoxicidad más investigado es el provocado por la inducción de estrés oxidativo en el interior de la célula que ha acumulado un nanomaterial, al generarse especies reactivas del oxígeno (ver *Figura 13*)⁶⁴⁻⁶⁶. Las ROS son indispensables para la vida cotidiana, como se destaca por su participación en la transducción de

señales y en el sistema inmune innato (efectores producidos para destruir patógenos y controlar las respuestas celulares). Sin embargo, el estrés oxidativo se debe a un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante. Las alteraciones en este estado normal redox pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos (H_2O_2) y radicales libres (OH^\bullet) que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN. De hecho, Stone y Donaldson⁶⁷ lo sugieren como el indicador adecuado para discriminar los efectos adversos de las distintas NPs a nivel celular y molecular. En general, los sistemas de defensa de un organismo contra el daño oxidativo al ADN son muy complejos, e incluyen la prevención de producción de las ROS, neutralizadores de las ROS y la reparación del ADN.

Asimismo, en circunstancias fisiológicas normales, las células están expuestas a una gran variedad de especies reactivas de oxígeno (ROS) endógenas y exógenas. Las ROS pueden ser generadas en la mitocondria por los complejos I y III dentro de la cadena de transporte de electrones, así como por la NADPH oxidasa. En presencia de la superóxido dismutasa mitocondrial, O_2^- se convierte en H_2O_2 , que luego puede difundir fuera de la mitocondria al citoplasma. Por otra parte, si en el citoplasma hay elevadas concentraciones de iones de hierro Fe^{2+} pueden reaccionar con el H_2O_2 para formar el radical OH^\bullet y el ión Fe^{3+} a través de la reacción Fenton⁶⁸. Estos iones de hierro provienen de los lisosomas donde las nanopartículas magnéticas, cuyo núcleo está compuesto por hierro, se han degradado en iones de hierro libres.

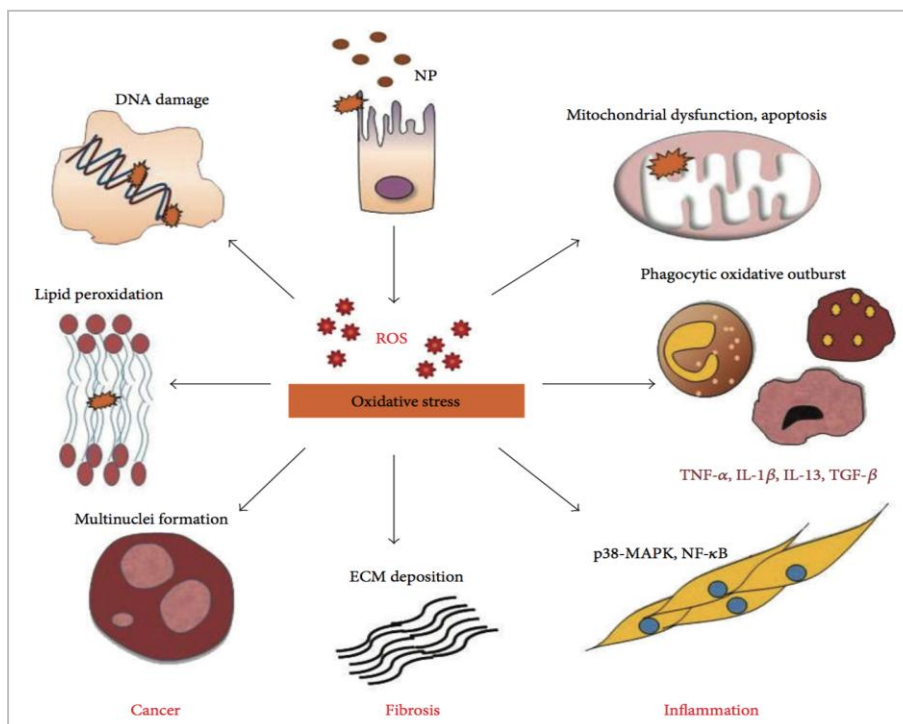


Figura 13.- Esquema representativo de la inducción de los efectos citotóxicos inducidos por las ROS. Tomada de *Biomed Res Int.* 2013; 942916 (2013).

En un inicio, los ensayos de viabilidad fueron los únicos realizados para considerar si una nanopartícula era biocompatible. Además, el test utilizado con mayor frecuencia -el ensayo colorimétrico del MTT- ha sido algo cuestionado al describirse que las NPs internalizadas podrían afectar el metabolismo mitocondrial y se ha propuesto el uso complementario de otros ensayos de citotoxicidad⁶⁹. Actualmente, hay una propuesta unánime dentro de la comunidad científica que investiga en NPs, para que todos los grupos utilicen una batería uniforme de metodologías que permitan analizar en profundidad la biocompatibilidad de los nanométricos diseñados.

En relación a los estudios *in vivo*, la biocompatibilidad de los nanomateriales que llevan fármacos está ligada a la respuesta del sistema inmune desencadenada después de su administración y a la toxicidad intrínseca del nanomaterial y/o de sus metabolitos originados por su biodegradación. Desde el punto de vista toxicológico, los nanomateriales y sus productos de degradación deberían ser

eliminados del organismo en el menor tiempo posible después de la liberación del fármaco que transportan. Obviamente, la toxicidad de las NPMs depende de numerosos factores incluyendo la composición química, el tamaño, la estructura, la carga superficial, la solubilidad, la ruta de administración, la dosis, así como su biodegradación, farmacocinética y biodistribución⁷⁰. La concentración de la dosis y la frecuencia de administración, son otros factores a tener en cuenta, además de la ruta de administración del fármaco. Las NPMs inyectadas intravenosamente son eliminadas de la circulación sanguíneas por macrófagos localizados en el sistema retículo-endotelial⁵⁵ y se acumulan principalmente en el hígado, en el bazo y en la médula ósea roja⁷¹. Éstas son metabolizadas en los lisosomas de dichas células⁸ y el hierro libre es incorporado a las reservas de hierro del cuerpo⁷². Reddy y col.⁷⁰ han descrito que altas dosis de NPMs inyectadas intravenosamente pueden inducir estrés oxidativo y problemas cardíacos y hepáticos; y que dosis elevadas de NPMs inyectadas intraperitonealmente pueden provocar un aumento del número de macrófagos del peritoneo induciendo una respuesta inmune.

6. Muerte celular

El término **quimioterapia** suele emplearse para designar aquéllos fármacos utilizados en el tratamiento de las enfermedades neoplásicas cuya función principal es matar a las células cancerígenas. La acción de los diferentes fármacos quimioterapéuticos varía según la dosis a la que se administre, pudiendo inducir diferentes mecanismos de muerte celular (principalmente, apoptosis, autofagia, necrosis y catástrofe mitótica). Asimismo, la quimioterapia asociada a nanopartículas también promueve diferentes tipos de muerte celular *in vitro* en función de la dosis empleada⁷³.

De todas las modalidades de muerte celular descritas en el año 2012, en base a criterios funcionales, por parte del Comité de Nomenclatura de Muerte Celular (*Nomenclature Committee on Cell Death*, NCCD) (ver *Tabla 3*)⁷⁴, sólo vamos a comentar la apoptosis intrínseca dependiente de caspasas y la catástrofe mitótica, ya que son los dos tipos de muerte celular detectados a lo largo de nuestras investigaciones.

Tabla 3.- Clasificación de las modalidades de muerte celular y sus características. Tomada de Cell Death Differ. 19: 107-120 (2012).

	Main biochemical features	Caspase dependence	Examples of inhibitory interventions ^a
Anoikis	Downregulation of EGFR Inhibition of ERK1 signaling Lack of β 1-integrin engagement Overexpression of BIM Caspase-3 (-6,-7) activation	++	BCL-2 overexpression Z-VAD-fmk administration
Autophagic cell death	MAP1LC3 lipidation SQSTM1 degradation	--	VPS34 inhibitors AMBRA1, ATG5, ATG7, ATG12 or BCN1 genetic inhibition
Caspase-dependent intrinsic apoptosis	MOMP Irreversible $\Delta\psi_m$ dissipation	++	BCL-2 overexpression Z-VAD-fmk administration
Caspase-independent intrinsic apoptosis	Release of IMS proteins Respiratory chain inhibition	--	BCL-2 overexpression
Cornification	Activation of transglutaminases Caspase-14 activation	+	Genetic inhibition of TG1, TG3 or TG5 Genetic inhibition of caspase-14
Entosis	RHO activation ROCK1 activation	--	Genetic inhibition of metallothionein 2A Lysosomal inhibitors
Extrinsic apoptosis by death receptors	Death receptor signaling Caspase-8 (-10) activation BID cleavage and MOMP (in type II cells) Caspase-3 (-6,-7) activation	++	CrmA expression Genetic inhibition of caspases (8 and 3) Z-VAD-fmk administration
Extrinsic apoptosis by dependence receptors	Dependence receptor signaling PP2A activation DAPI1 activation Caspase-9 activation Caspase-3 (-6,-7) activation	++	Genetic inhibition of caspases (9 and 3) Genetic inhibition of PP2A Z-VAD-fmk administration
Mitotic catastrophe	Caspase-2 activation (in some instances) TP53 or TP73 activation (in some instances) Mitotic arrest	--	Genetic inhibition of TP53 (in some instances) Pharmacological or genetic inhibition of caspase-2 (in some instances)
Necroptosis	Death receptor signaling Caspase inhibition RIP1 and/or RIP3 activation	--	Administration of necrostatin(s) Genetic inhibition of RIP1/RIP3
Netosis	Caspase inhibition NADPH oxidase activation NET release (in some instances)	--	Autophagy inhibition NADPH oxidase inhibition Genetic inhibition of PAD4
Parthanatos	PARP1-mediated PAR accumulation Irreversible $\Delta\psi_m$ dissipation ATP and NADH depletion PAR binding to AIF and AIF nuclear translocation	--	Genetic inhibition of AIF Pharmacological or genetic inhibition of PARP1
Pyroptosis	Caspase-1 activation Caspase-7 activation Secretion of IL-1 β and IL-18	++	Administration of Z-YVAD-fmk Genetic inhibition of caspase-1

La **apoptosis** o muerte celular programada funciona por señales celulares controladas genéticamente. Es un mecanismo de muerte celular fundamental para el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos. Por lo tanto, es imprescindible que en los tejidos haya un equilibrio perfecto entre las células que proliferan y las que mueren por apoptosis. Cualquier alteración en ese equilibrio lleva implicadas enfermedades en el ser humano, como el cáncer o el Alzheimer.

Este tipo de muerte celular se caracteriza por presentar determinados cambios morfológicos: reducción del volumen celular acompañado de cambios en la estructura del núcleo donde la cromatina se condensa y forma densos acúmulos adosados a la envoltura nuclear, esto es seguido de invaginaciones de la membrana nuclear y termina con la fragmentación del núcleo en estructuras membranosas con cantidades variables de cromatina. De manera análoga, la membrana celular experimenta evaginaciones que terminan por fragmentar a la célula formando racimos de vesículas de tamaño variable que contienen orgánulos intactos que no se fusionan con los lisosomas. A estas vesículas se les denomina cuerpos apoptóticos, los cuales son rápidamente fagocitados por células vecinas o macrófagos.

Por lo tanto, una de las consecuencias fisiológicas más relevantes de la muerte por apoptosis es que no se libera material intracelular al medio externo y por lo tanto no se induce una respuesta inflamatoria. Además, es un proceso activo que implica síntesis proteica y la intervención de unas proteínas denominadas caspasas.

Las caspasas son proteasas implicadas directamente en el proceso apoptótico, tanto en el desencadenamiento como en la actuación que conduce a la muerte celular. Se han identificado 14 tipos de caspasas que se pueden dividir en dos grandes grupos: iniciadoras (1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11 y 12) y ejecutoras (3, 6, 7 y 14), que están implicadas en la apoptosis.

El control de la apoptosis es llevado a cabo principalmente por una familia de proteínas que se ha denominado Bcl-2. Dentro de esta familia existen miembros anti-apoptóticos, como Bcl-2 y Bcl-X_L y miembros pro-apoptóticos, como Bax, Bak, Bid y Bad (entre otros). Los miembros anti-apoptóticos suelen localizarse anclados a la membrana externa mitocondrial e impiden la liberación del citocromo C de la cadena respiratoria que está en el espacio intermembrana hacia el citosol. Por el contrario, los miembros pro-apoptóticos están localizados en el citosol y después de un estímulo apoptótico, se translocan a la membrana mitocondrial externa permitiendo la liberación del citocromo C (entre otras moléculas).

La apoptosis intrínseca dependiente de caspasas (ver *Figura 14*). En esta vía el estímulo apoptótico se desencadena en el interior celular. La naturaleza del estímulo puede ser muy variada y

puede resultar de un daño al ADN o por un estrés celular. En esta ruta se produce la salida del citocromo C desde el espacio intermembrana de la mitocondria al citosol. El citocromo C interacciona con una molécula adaptadora denominada Apaf-1 que a su vez recluta a la procaspasa 9 (iniciadora) y junto con ATP o dAPT forman el apoptosoma. Como resultado se produce la activación de la caspasa 9, que a su vez activará a caspasas efectoras (caspasas 3 y 7), y éstas activarán a endonucleasas y proteasas, responsables de las características morfológicas y bioquímicas de la muerte por apoptosis⁷⁴⁻⁷⁶.

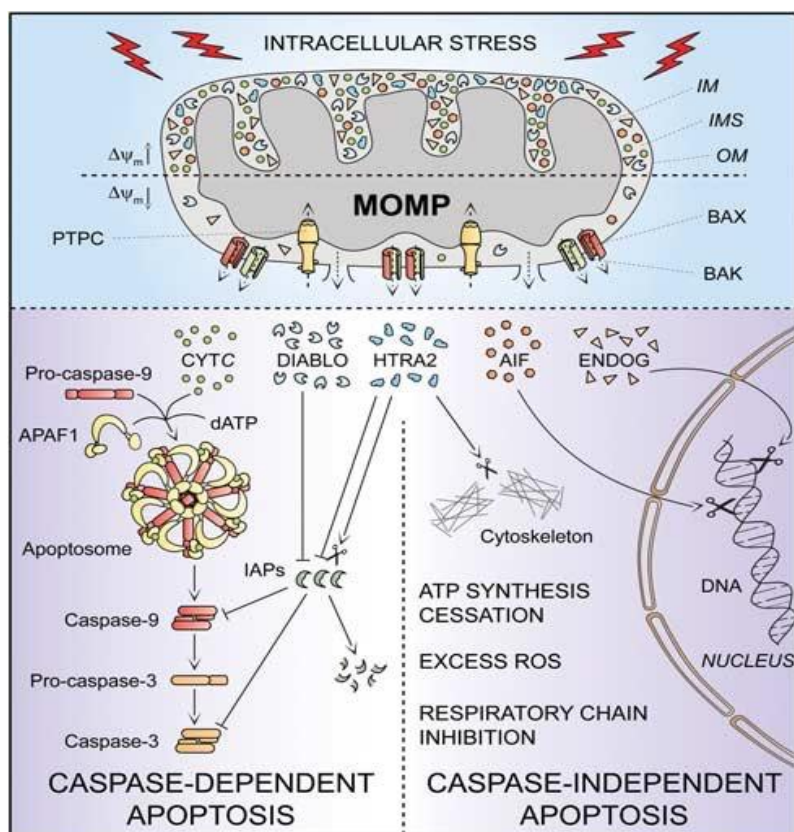


Figura 14.- Representación esquemática de la vía apoptótica intrínseca. Tomada de Cell Death Differ. 19: 107-120 (2012).

La **catástrofe mitótica** es un término que se utiliza de forma restrictiva para indicar un tipo de muerte celular que se produce durante o después de un fallo en la mitosis, y puede finalizar induciendo distintas respuestas celulares. En condiciones normales estas células mueren por activación del mecanismo de la apoptosis. En las células en las que no se efectúa la apoptosis -en respuesta a un daño en el ADN o del huso mitótico- se produce una mitosis defectuosa que da lugar a: i) células aneuploides, que completan la división celular con citocinesis pero las dos células hijas contienen diferente número de cromosomas. Estas células pueden morir/bloquear el crecimiento o pueden sufrir una división asimétrica en la siguiente ronda de división que puede finalizar en la muerte celular o generar otras dos células aneuploides; ii) células poliploides (tetraploides), que completan la división celular sin producirse la citocinesis. Estas células pueden morir, permanecer en estado senescente o ser propensa a sufrir divisiones multipolares en la siguiente ronda de división celular, que puede desencadenar directamente la muerte celular, o puede resultar en la generación de tres o más células hijas, o en otra célula poliploide (octaploide) al no producirse la citocinesis, o en células aneuploides. Cualquiera de las vías conduce a la muerte celular o bien las células quedan en un estado senescente (ver *Figura 15*).

Este tipo de muerte celular puede identificarse por la aparición de mitosis aberrantes, células de gran tamaño multinucleadas y con micronúcleos que presentan la cromatina parcialmente condensada, un bloqueo en la fase G₂ del ciclo celular, un aumento de la actividad β -galactosidasa y una reducción de la función telomerasa⁷⁷.

La inducción de la catástrofe mitótica se puede producir por agentes que afectan directamente a la integridad del material genético (por ejemplo, agentes que dañan el ADN), mientras que otros interfieren con la compleja maquinaria molecular que asegura la correcta segregación de los cromosomas (por ejemplo, drogas que afectan a los microtúbulos, como los taxoles). Se sabe que algunos fármacos antitumorales y la radiación ionizante inducen también catástrofe mitótica, pero su regulación y las señales que están involucradas están poco caracterizadas⁷⁷.

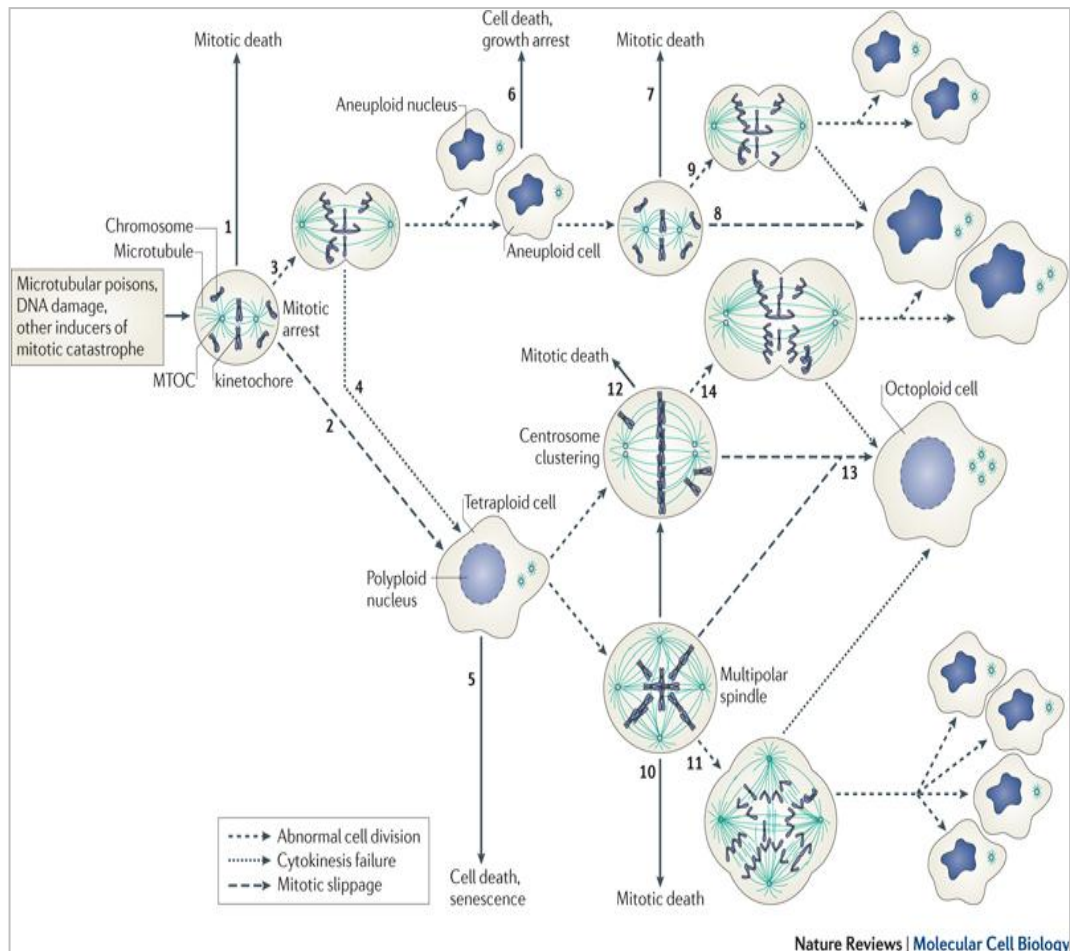


Figura 15.- Modelo de muerte celular por catástrofe mitótica. Tomada de Nat Rev Mol Cell Biol. 12: 385-392 (2011).

Contrariamente a la muerte por apoptosis, se ha observado que la catástrofe mitótica es independiente de la proteína p53. Esto es importante ya que la mayoría de los tumores sólidos presentan una p53 mutada y/o inactiva, por lo que el estudio de los mecanismos que inducen catástrofe mitótica puede contribuir notablemente a mejorar la eficacia de las terapias antitumorales⁷⁴.

Asimismo, se ha demostrado tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*, que las diferentes vías de muerte celular aparecen asociadas en las células tumorales. Por ejemplo, la catástrofe mitótica a

veces desencadena la activación de caspasas (-9 iniciadora y -3 ejecutora) y otras proteínas pro-apoptóticas, lo que implica que la catástrofe mitótica y la apoptosis compartan ciertos rasgos^{77,78}.

7. Células madre tumorales

Las células madre adultas de un tejido normal se definen como células no diferenciadas con la capacidad de generar células madre descendientes -por autorrenovación- y de diferenciarse en una variedad de células especializadas en un tejido u órgano. Por ello, las dos propiedades intrínsecas de las células madre adultas de un tejido normal son:

- La autorrenovación. Implica que las células madre proliferan indefinidamente y mantienen las características autólogas (aunque también estas células madre pueden permanecer en un estado quiescente), y que tengan el potencial de clonación, lo que sugiere que estas células puedan generar células fenotípicamente similares a sí mismas a través de la replicación genética. Ocurre mediante divisiones asimétricas.
- La diferenciación. Implica la capacidad de diferenciarse en diversos tipos de células especializadas. Ocurre por divisiones simétricas.

Al igual que ocurre en los tejidos sanos, los tumores no son sólo masas de células malignas que presentan distinta morfología, grado de diferenciación, capacidad proliferativa, e invasividad, sino órganos complejos en los que se recluta a muchas otras células (linfocitos, fibroblastos, macrófagos, neutrófilos y células de vasos sanguíneos y linfáticos, etc)⁷⁹. Recientemente, se ha identificado un pequeño grupo de células dentro de esa masa maligna de células, a las que se les ha denominado **células madre tumorales (CMTs)**, ya que son las responsables de la iniciación y progresión de tumor, e incluso pueden estar involucradas en la formación de metástasis y la recurrencia. Además, estas células se dividen lentamente, se mantienen con vida en el tiempo y tienen una tasa proliferativa baja, por lo que representan la población celular más adecuada para acumular mutaciones⁸⁰.

Las CMTs (en inglés conocidas como *cancer stem cells*) y las células madre adultas de un tejido normal presentan una serie de características similares, como la autorrenovación y la

diferenciación celular. La diferencia entre las CMTs y las células madre adultas es que las células madre funcionan bajo un control, mientras que la división y la diferenciación de las CMTs están fuera de control. Esta propiedad permite generar un gran número de células tumorales para mantener el crecimiento y la heterogeneidad del tumor, a través de su continua renovación y diferenciación⁸⁰.

Como se acaba de comentar, las características de una célula madre adulta de un tejido normal se asimila al fenotipo de una célula madre tumoral, por lo que las mutaciones necesarias para su comportamiento maligno serían menores, ya que muchas de las características propias de su comportamiento tumoral ya las tendrían de forma constitutiva⁸¹.

Hoy en día se cree que la mayoría de los tumores surgen de una sola célula que se desarrolla dentro de una población heterogénea. Sin embargo, se han propuesto dos modelos diferentes para explicar el crecimiento y la heterogeneidad del tumor, es decir, para explicar el posible origen del cáncer⁸² (ver *Figura 16*):

- A. El modelo estocástico o de evolución clonal. Postula que una o varias células del tejido adquieren una mutación y que, a partir de ésta y a través de un proceso de división no controlado, van acumulándose nuevas alteraciones genéticas que, mediante la selección de los clones más aptos, alcanzan el estado de célula tumoral, dando finalmente lugar al tumor. Según este modelo, todas las células tumorales contribuyen al mantenimiento y expansión del tumor, así como a generar nuevos tumores. La variación intercelular se atribuye principalmente a las diferencias entre los subclones que resultan de los cambios genéticos y/o epigenéticos durante el desarrollo tumoral.
- B. El modelo jerárquico o basado en la célula madre tumoral. Implica la existencia de una célula de origen en el tumor con propiedades de célula madre, capaz de proliferar y mantenerse de forma indefinida gracias a su capacidad autorrenovadora. Según este modelo, dentro de los tumores hay una población celular capaz de autorrenovarse y de generar toda la variabilidad celular que compone dicho tumor. En este caso, sólo las CMTs presentan la capacidad de dividirse tanto de forma simétrica, generando células del mismo tipo, como asimétrica, originando progenitores de amplificación rápida, pero transitoria. Estos progenitores darán

lugar a precursores comprometidos con un linaje que formarán células tumorales diferenciadas y sin capacidad tumorigénica, que compondrán el grueso del tumor. Las células progenitoras del cáncer se caracterizan por mostrar una baja capacidad de autorrenovación y una mayor probabilidad de diferenciación en comparación con las CMTs.

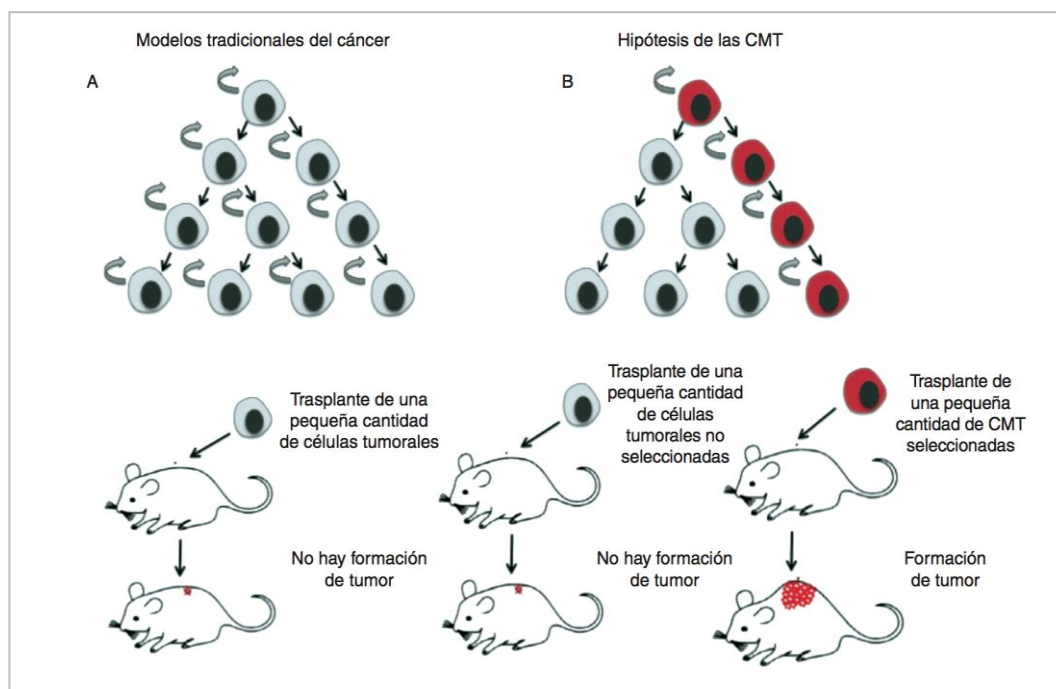


Figura 16.- Representación gráfica de los modelos de cáncer. (A) Modelo estocástico. (B) Modelo jerárquico basado en la CMT. Tomado de Rev Senol Patol Mamar. 25: 107-115 (2012).

En términos generales, el modelo de las células madre tumorales enfatiza el concepto de heterogeneidad funcional sin tener en cuenta la existencia de la variación genética intracelular. Por el contrario, el modelo de la evolución clonal se centra en la heterogeneidad genética, pero ignora la variación funcional dentro de los diferentes grupos de células que forman un tumor.

Poco se sabe hasta el momento sobre cuál es la célula diana de la transformación que da lugar a la CMT, es decir, sobre la célula que da origen al cáncer, pero se postulan varias hipótesis acerca de este origen⁸⁰ (ver Figura 17):

- A. Desde las células madre adultas. La primera teoría propone que las células madre adultas pueden generar células madre tumorales ya que las CMTs comparten muchas propiedades con las células madre adultas: la capacidad de autorrenovación y de diferenciación no direccional, muchas de las vías de señalización y la actividad telomerasa. Otra teoría asocia a las células madre con la formación de tumores en los tejidos con una alta tasa de renovación celular (como es el tejido epitelial y el sistema hematopoyético). La última teoría propone que las células madre en desarrollo están mutadas y esta mutación pasa a sus descendientes, por lo que hay más probabilidad de inducir un tumor.
- B. Desde una célula diferenciada que haya adquirido las propiedades de célula madre. Estas células obtienen la capacidad de autorrenovación, por lo que pueden acumular más fácilmente mutaciones para inducir la formación de un tumor.

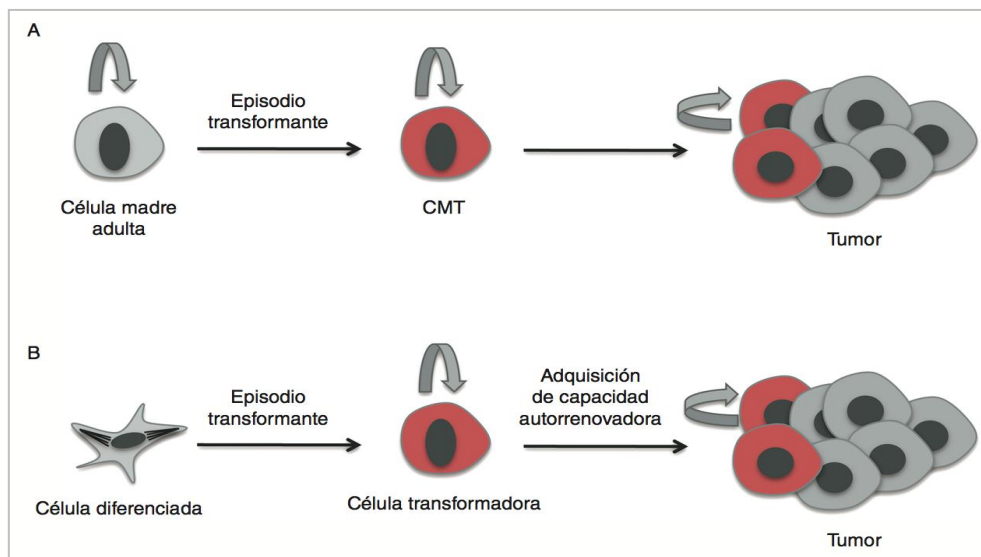


Figura 17.- Representación gráfica de la célula de origen del cáncer. (A) Representa el origen en una célula madre adulta, y (B) en una célula diferenciada que adquiere las capacidades de célula madre. Tomada de Rev Senol Patol Mamar. 25: 107-115 (2012).

Las características que podrían identificar a las CMTs son:

- Los marcadores de membrana. Los distintos y específicos marcadores de membrana pueden ser usados para distinguir las CMTs de otras células tumorales y de las células madre normales⁸². A continuación, se muestra un resumen de los marcadores de membrana específicos de los diferentes tipos de cáncer (*Tabla 4*):

Tabla 4.- Resumen de los marcadores de superficie de los distintos tipos de cáncer. Tomada de *Acta Pharmacol Sin.* 34: 732-740 (2013).

Tumor type	Phenotype of CSCs markers
Leukemia	CD34 ⁺ CD38 ⁻ HLA-DR ⁻ CD71 ⁻ CD90 ⁻ CD117 ⁻ CD123 ⁺
Breast cancer	ESA ⁺ CD44 ⁺ CD24 ^{-/low} Lineage ⁻ , ALDH-1 ^{high}
Liver cancer	CD133 ⁺ , CD49f ⁺ , CD90 ⁺
Brain cancer	CD133 ⁺ , BCRP1 ⁺ , A2B5 ⁺ , SSEA-1 ⁺
Lung cancer	CD133 ⁺ , ABCG2 ^{high}
Colon cancer	CD133 ⁺ , CD44 ⁺ , CD166 ⁺ , EpCAM ⁺ , CD24 ⁺
Multiple myeloma	CD138 ⁻
Prostate cancer	CD44 ⁺ , α2β1 ^{high} , CD133 ⁺
Pancreatic	CD133 ⁺ , CD44 ⁺ , EpCAM ⁺ , CD24 ⁺
Melanoma	CD20 ⁺
Head and neck cancer	CD44 ⁺

- Los transportadores de la familia ABC. Son transportadores de membrana que pueden bombear diversas moléculas pequeñas, como fármacos citotóxicos y colorantes, fuera de las células. Las células madre de un tejido normal y las CMTs parecen expresar altos niveles de transportadores ABC. Este fenómeno podría contribuir a la resistencia a múltiples fármacos, lo que se traduce en bajas concentraciones de fármacos intracelulares.
- Las vías de señalización. Las vías y elementos que están implicados en el control de autorrenovación y diferenciación de las CMTs y las células madre normales incluyen: PI₃K/Akt, JAK/STAT, Wnt/β-catenina, Hedgehog, Notch, NF-kB, PTEN, y otros.
- El microambiente. Las interacciones entre células tumorales y no transformadas crean el microambiente tumoral. Las células no malignas tienen una función dinámica y, a

menudo promotora de tumores en todas las etapas de la carcinogénesis. La comunicación intercelular es impulsada por una red compleja y dinámica de citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, enzimas inflamatorias y la remodelación de la matriz extracelular, lo que perturba las propiedades físicas y químicas de los tejidos. De esta forma, un tumor puede cambiar su microambiente y el microambiente puede afectar la forma en que el tumor crece y se disemina⁷⁹.

Asimismo, las estrategias terapéuticas actuales contra el cáncer tienen severas limitaciones, ya que la mayoría de los tumores se hacen resistentes a la quimioterapia y la radioterapia. Además, muchas estrategias que no son suficientemente selectivas contra las CMTs pueden ser tóxicas para los tejidos sanos, y los pacientes pueden sufrir un riesgo de recurrencia y metástasis. Estos hechos ponen de manifiesto que las CMTs son más resistentes a las terapias convencionales que el resto de células que forman un tumor. El principal objetivo de las terapias actuales está dirigido a la eliminación de las CMTs sin perjudicar a otros tipos de células⁸² basándose en: la expresión diferencial de los marcadores de membrana, la expresión alterada de los transportadores de fármacos, las vías de señalización alteradas y el microambiente tumoral (ver *Figura 18*).

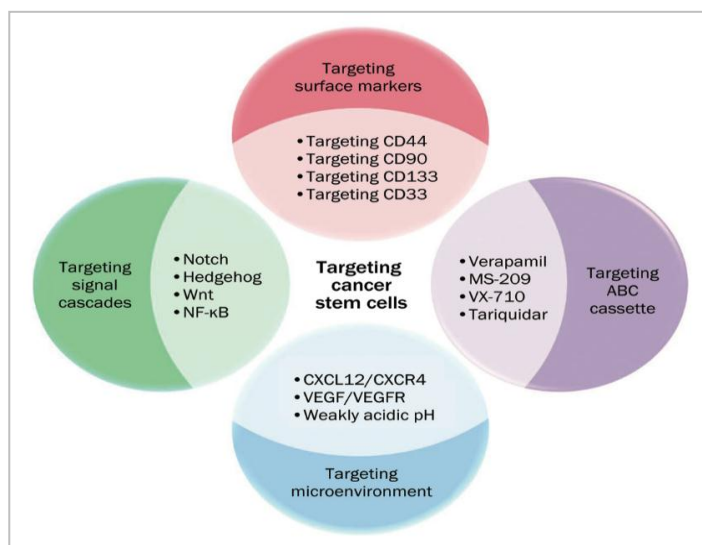


Figura 18.- Posibles terapias contra las células madres tumorales.
Tomada de *Acta Pharmacol Sin.* 34: 732-740 (2013).

En cuanto a las implicaciones clínicas, una vez que el cáncer se ha diagnosticado, los tratamientos varían según el tipo de cáncer y la gravedad. Los tratamientos antitumorales clásicos, como la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia o la terapia hormonal, representan enfoques tradicionales diseñados para eliminar a las células tumorales que se dividen rápidamente, es decir, las células que forman la mayor parte del tumor, pero no generan una respuesta de eliminación total de las células tumorales, por lo que en muchos casos no se alcanza la curación completa de la enfermedad. Los tratamientos antitumorales se basan en el modelo estocástico, ya que usan como parámetro la disminución de la masa del tumor a corto plazo. A las CMTs se les atribuye la capacidad de evadir estos tipos de tratamientos, lo que da lugar a las recidivas y a las metástasis, ya que estas células son de índice mitótico bajo, las que se dividen lentamente y a las que en menor medida les afectan este tipo de fármacos⁸⁰. Se ha descrito que la quimioterapia convencional incrementa la población de células $CD44^+/CD24^-$ y la capacidad de formar mamóferas *in vitro* en tumores de mama avanzados⁸³.

Actualmente, se está investigando en la búsqueda de agentes dirigidos contra las CMTs, que no darán lugar a una gran disminución de la masa tumoral, pero tendrán un efecto importante en la recurrencia de la enfermedad. Asimismo, continúa la búsqueda de agentes dirigidos contra las células tumorales en general, que permitirán una reducción importante del tamaño del tumor, pero no una reducción en la recidiva^{80,84} (ver *Figura 19*).

En estudios recientes se ha demostrado que las células tumorales diferenciadas, pueden adquirir propiedades de CMTs mediante el proceso de la transición epitelio-mesénquima, y así dar lugar a la necesidad de realizar tratamientos dirigidos tanto contra las CMTs, como contra el resto de las células del tumor, para obtener resultados eficaces. La combinación de tratamientos dirigidos a las CMTs con quimioterapia y/o radioterapia convencional, puede conducir a la destrucción de ambas poblaciones. Actualmente, hay distintos ensayos clínicos basados en tratamientos dirigidos contra la población de las CMTs.

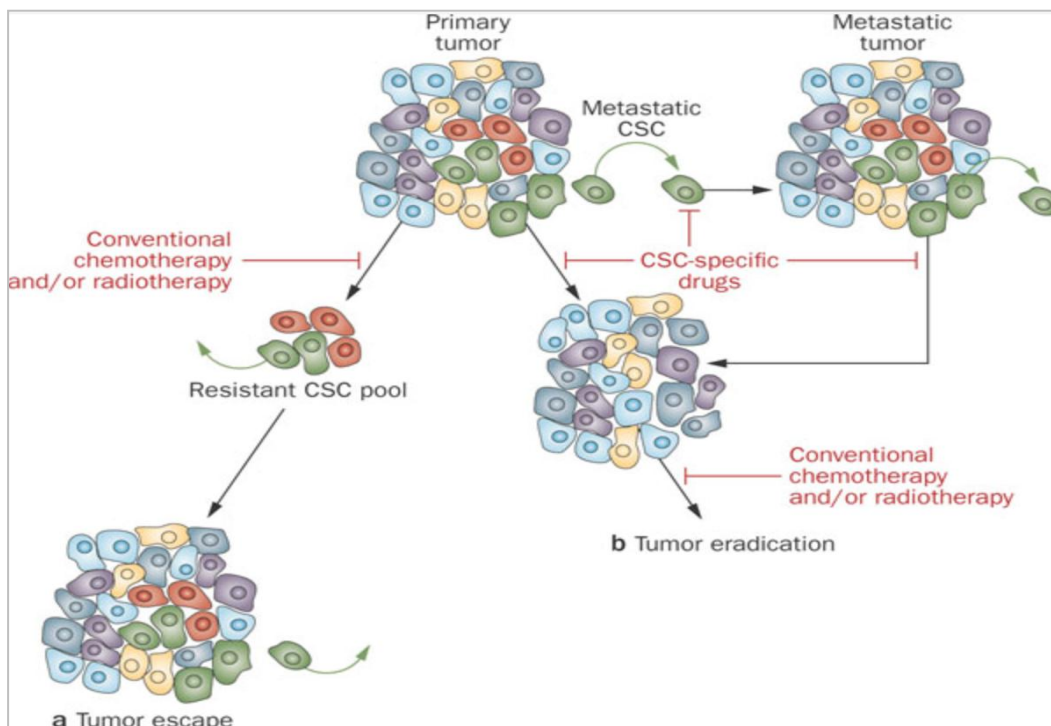
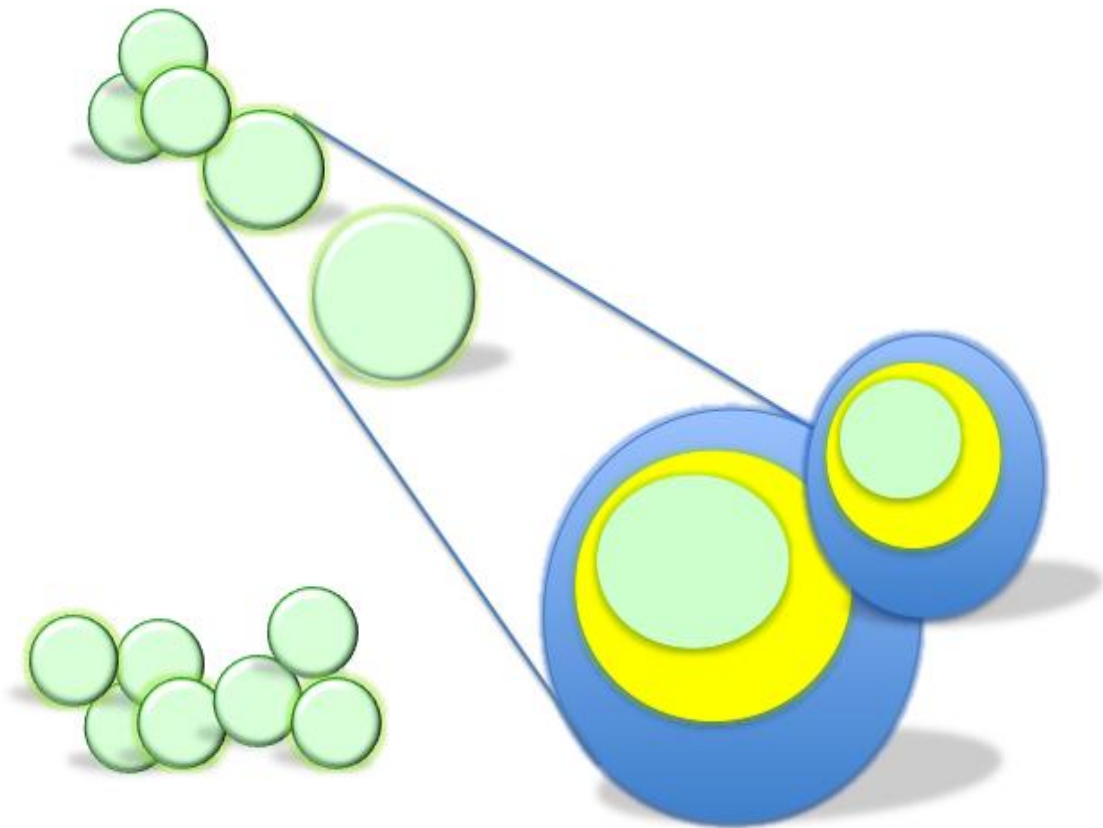


Figura 19.- Diagrama esquemático de la tumorogénesis y de las implicaciones de las CMTs para la terapia del cáncer. Composición heterogénea de un tumor: células tumorales (color amarillo, celeste, azul y morado), pequeña subpoblación de CMTs (color rojo) y CMTs metastásicas (color verde). Tomada de *Nat Rev Clin Oncol.* 6: 580-586 (2009).

Las nuevas investigaciones están siendo enfocadas a desarrollar nanopartículas conjugadas con cuatro elementos primordiales: i) una molécula que las dirija específicamente a las CMTs; ii) un fármaco antitumoral citotóxico para eliminar a las CMTs; iii) un quimio-sensibilizador para eliminar la resistencia a determinados fármacos (por ejemplo, un inhibidor de los transportadores ABC); y iv) un agente de imagen para facilitar el diagnóstico del tumor⁸². De esta manera se obtendrá una verdadera y completa curación del cáncer.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HYPOTHESIS AND OBJECTIVES



Hipótesis y Objetivos

Teniendo en cuenta que se están desarrollando nuevas estrategias que permitan incrementar la eficacia de los tratamientos antitumorales induciendo mínimos efectos secundarios, se planificó un diseño experimental de la presente Tesis Doctoral a través de la siguiente **Hipótesis** de partida:

El diseño de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro biocompatibles y multifuncionalizadas, permitiría alcanzar múltiples objetivos: un diagnóstico precoz de la enfermedad neoplásica (mediante RMI), así como, la aplicación simultánea de terapias con distintos mecanismos de actuación (fármacos y/o moléculas antineoplásicas + hipertermia), lo que permitiría utilizar dosis menores de las sustancias antitumorales (y por lo tanto una reducción de los efectos secundarios), así como la evasión a la quimiorresistencia por parte de las células tumorales.

Partiendo de esta hipótesis, el **objetivo general** que nos propusimos para desarrollar el presente proyecto de investigación, fue identificar en cultivos celulares el tipo de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro más adecuadas para su posible aplicación médica como: i) agentes portadores y liberadores de fármacos antitumorales, en concreto la doxorubicina, ii) agentes superparamagnéticos capaces de elevar la temperatura de forma local, durante la aplicación de un campo magnético alterno, y iii) agentes de contraste para el diagnóstico por imagen.

Para alcanzar este triple objetivo general, nos propusimos los siguientes **objetivos específicos**:

1. Analizar la capacidad de acumulación de distintos tipos de nanopartículas magnéticas en distintas líneas celulares tumorales humanas.
2. Identificar el mecanismo de entrada de las diferentes nanopartículas magnéticas.
3. Determinar la localización subcelular de las mismas.

4. Evaluar sus posibles efectos citotóxicos, es decir, su biocompatibilidad, utilizando múltiples parámetros.
5. Identificar las nanopartículas magnéticas que presenten las propiedades más adecuadas para las distintas aplicaciones biomédicas: transporte de fármacos antitumorales, hipertermia intracelular y como agentes de contraste.
6. Identificar los mecanismos de inactivación celular inducidos por las nanopartículas magnéticas que transporten fármacos antineoplásicos.
7. Analizar su eficacia para sensibilizar a las células madre tumorales.

Hypothesis and Objectives

Nowadays, researchers are focusing on finding new strategies to increase the effectiveness of anticancer treatments with minimal side effects. For this purpose, PhD thesis experimental approach was proposed based on the following hypothesis:

The design of functionalized and biocompatible iron oxide magnetic nanoparticles, which will be administered to the patient with cancer, would achieve multiple objectives: early diagnosis of neoplastic disease (by MRI) and the simultaneous application of therapies with different mechanisms of action (drugs and/or antineoplastic molecules + hyperthermia). This would allow the use of a lower dose of the anticancer substances (and therefore reduce side effects) and it would also prevent tumor cells from escaping therapy intervention.

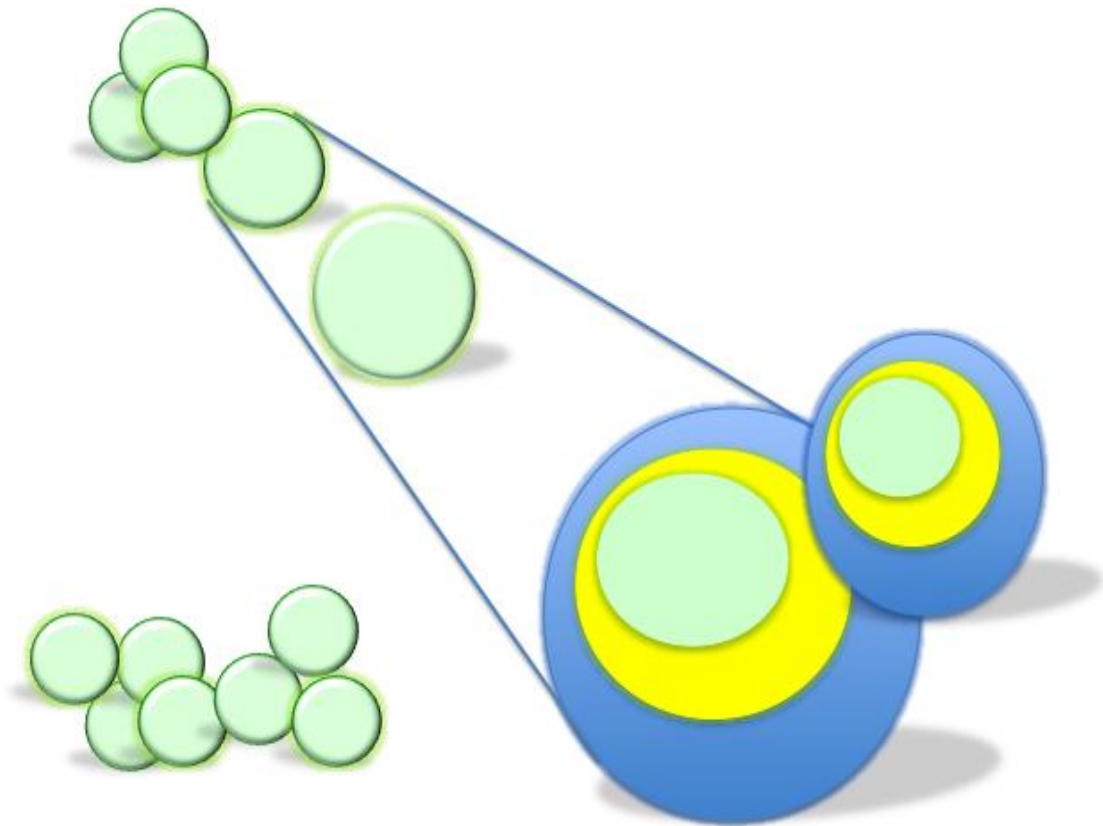
Based on this hypothesis, the **overall objective** of this research project is to identify the most appropriate type of magnetic nanoparticles in vitro, for their possible use in medical application, such as: i) antitumor drug carriers and release agents like doxorubicin, ii) superparamagnetic agents that are able to raise the temperature locally, during the application of an alternating magnetic field, and iii) contrast agents for diagnostic imaging.

In order to achieve the triple overall objective mentioned above, it is necessary to address the following **specific objectives**:

1. Analyse the accumulation capacity of different types of magnetic nanoparticles in human tumour cell lines.
2. Identify the cellular uptake mechanisms of magnetic nanoparticles.
3. Determine the subcellular localization of magnetic nanoparticles.
4. Evaluate their potential potential cytotoxicity by multiple parameters.

5. Select the magnetic nanoparticles that present most suitable properties for different medical applications: transport antitumor drugs, intracellular hyperthermia and as contrast enhancement agents for imaging.
6. Identify the mechanisms of cell killing induced by magnetic nanoparticles carrying antineoplastic drugs.
7. Study their efficiency to sensitise cancer stem cells.

MATERIALES Y MÉTODOS



1. Tipos de nanomateriales y fármacos

Las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro utilizadas en este estudio, poseen diferentes tipos de recubrimiento, lo que a su vez les otorga una carga superficial distinta: las recubiertas de dextrano (D) tienen una carga prácticamente neutra; las revestidas de aminodextrano (AD) y de aminopropilsilano (APS) están cargadas positivamente; mientras que las cubiertas de ácido dimercaptosuccínico (DMSA) y de heparina (H) poseen una carga negativa. Estas nanopartículas magnéticas fueron obtenidas por diferentes rutas de síntesis, incluyendo la coprecipitación y descomposición en medio orgánico^{8,18}. Las principales características de estas NPs se han recogido en la *Tabla 5*:

Tabla 5.- Propiedades estructurales y coloidales de las nanopartículas utilizadas.

Tipo de recubrimiento	Diámetro núcleo (nm)	Radio hidrodinámico (nm)	Potencial Z (mV) a pH 7
Dextrano (D)	10	100	-9
Heparina (H)	10	120	-27
Ácido dimercaptosuccínico (DMSA)	9-15	110	-34
Aminodextrano (AD)	6.5	142	+25
Aminopropilsilano (APS)	8.6	60	+35

En el presente estudio, también se han analizado otros tipos de nanomateriales para su aplicación como agentes de contraste. En concreto, nanopartículas de magnetita de forma alargada (nanovarillas, nanorods) recubiertas de diferentes cationes (Ni, Sn, Cu, Mn) y aluminio, y nanopartículas de magnetita de forma esférica recubiertas de bismuto y PEG.

Para la unión al fármaco se han utilizados nanopartículas magnéticas con un diámetro medio del núcleo de 12 nm y recubiertas de DMSA. Como fármaco antitumoral se empleó la doxorrubicina (DOX) que fue unida a dichas nanopartículas covalentemente mediante una molécula de enlace (linker). En este trabajo se han estudiado tres tipos de enlaces diferentes, para seleccionar el que fuera más eficaz para liberar la DOX en el interior de las células:

- Enlace sensible al ambiente reductor (O-DOX): la molécula enlace se une a la DOX por el grupo amino ($-NH_2$) a través de la formación de un grupo amida ($-CO-NH-$). Además, esta molécula de enlace presenta un puente disulfuro ($-S-S-$) activado, que reacciona con los grupos tioles ($-SH$) presentes en la superficie de las NPMs formándose un puente disulfuro ($-S-S-$). Este puente disulfuro, sensible al ambiente reductor, se rompería en presencia de agentes reductores dando lugar a la liberación de la DOX (ver *Figura 20*).

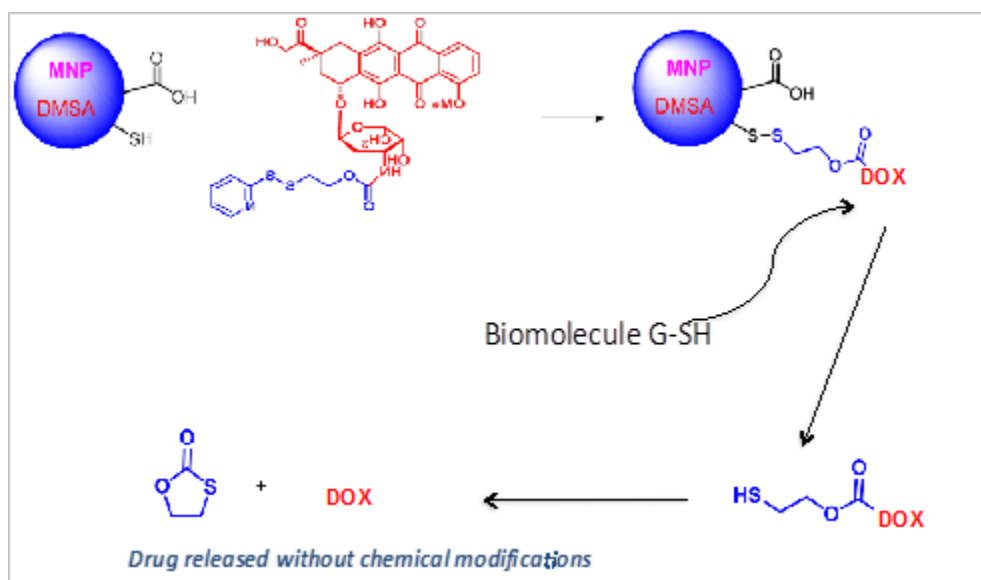


Figura 20.- Esquema de la inmovilización covalente de la DOX mediante el enlace O-DOX y su liberación.

- Enlace sensible al pH (M-DOX): la molécula de enlace establece unión con la DOX por el ácido carboxílico (-COOH) a través de la formación de un grupo imino (-NH-). Asimismo, esta molécula de enlace presenta un grupo maleimido ($\text{H}_2\text{C}_2(\text{CO})_2\text{N-}$) que reacciona con los grupos tioles (-S-H) presentes en la superficie de las NPMs formándose un enlace covalente. El enlace imino (-NH-), que es sensible al pH, puede romperse en condiciones ácidas dando lugar a la liberación de la DOX (ver *Figura 21*).

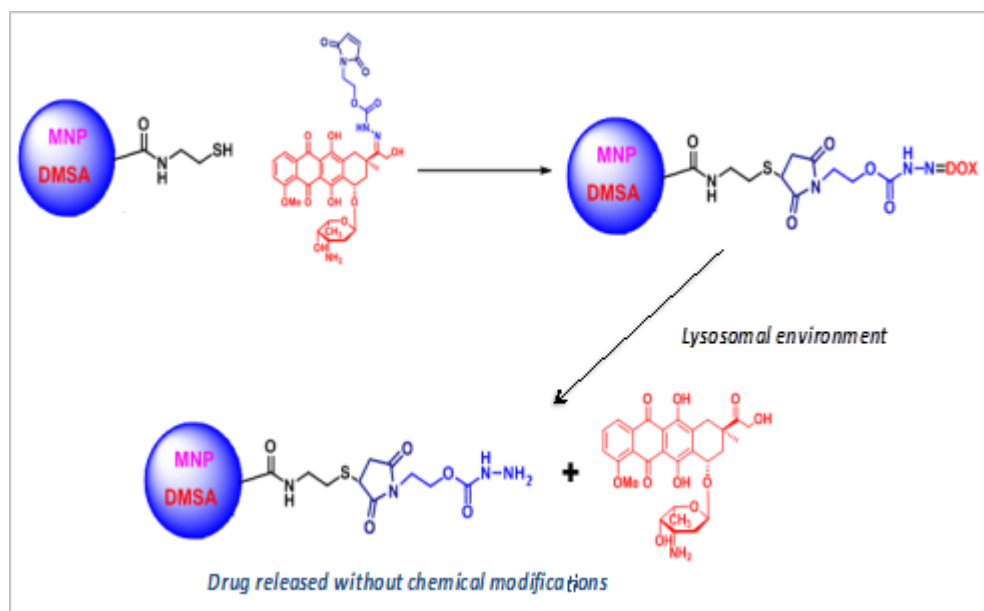


Figura 21.- Esquema de las reacciones para inmovilización covalente de la DOX mediante el enlace M-DOX y su liberación.

- Enlace sensible al ambiente reductor y al pH (I-DOX): la molécula de enlace se une a la DOX por el ácido carboxílico (-COOH) a través de la formación de un grupo imino (-NH-). Además, esta molécula de enlace presenta un puente disulfuro (-S-S-) activado, que reacciona con los grupos tioles (-SH) presentes en la superficie de las NPMs formándose un puente disulfuro (-S-S-). Este tipo de formulación presenta un puente disulfuro (-S-S-)

que es sensible al ambiente reductor, y un enlace imino (-NH-) que es sensible al pH, pudiéndose romper en condiciones ácidas (ver Figura 22).

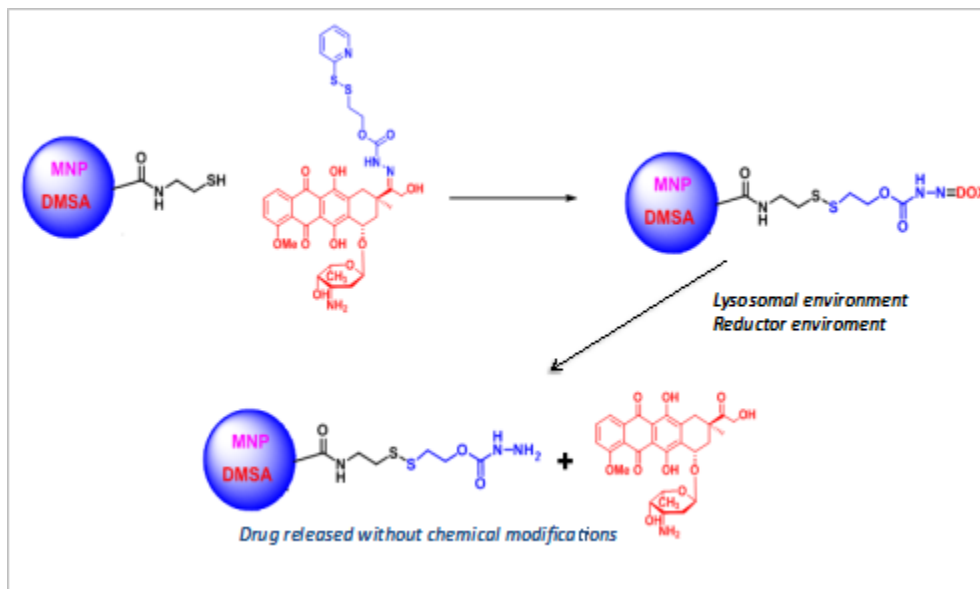


Figura 22.- Esquema de la inmovilización covalente de la DOX a través del enlace I-DOX y su liberación.

En los tres casos de inmovilización covalente, la concentración final de las NPMs fue de 0.1 mg Fe ml⁻¹ y de las NPMs unidas a doxorubicina (MNP-O-DOX, MNP-M-DOX y MNP-I-DOX) fue de 0.1 mg Fe ml⁻¹ para las MNP y 2.4 μM para la DOX.

En todos los experimentos, antes de administrarlas a las células disueltas en medio de cultivo, tanto las partículas sin funcionalizar como las funcionalizadas, fueron previamente disgregadas en un sonicador Elmasonic S 30 (Elma; Singen, Alemania) durante 5 min. A continuación, las partículas fueron filtradas y mezcladas con el medio de cultivo, y sonicada nuevamente la mezcla durante 1 min, inmediatamente antes de proceder a la incubación con las células.

2. Cultivos celulares

La investigación se ha llevado a cabo en distintas líneas celulares tumorales establecidas de diferente origen tumoral y con distintos perfiles génicos:

HeLa (ATCC® CCL-2.2™). Se trata de una línea celular establecida procedente de un adenocarcinoma humano de cérvix. Estas células contienen el virus del papiloma humano VPH 18 y tienen el gen *p53* (también llamado guardián del genoma) mutado⁸⁵, pero expresan la proteína caspasa-3 activa⁸⁶.

MCF-7 (ATCC® HTB-22™). Es una línea celular establecida procedente de un adenocarcinoma humano de mama. Estas células expresan los receptores para estrógenos (ER+) y progesterona (PR+), pero no el receptor del factor de crecimiento de tipo epidérmico humano (HER2-)⁸⁷. Además, esta línea celular no expresa la proteína caspasa-3 activa^{88,89} y el gen *p53* no está mutado⁹⁰.

MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™). Se trata de una línea celular establecida procedente de un adenocarcinoma humano de mama. Estas células no expresan los receptores para estrógenos (ER-), ni progesterona (PR-) ni del factor de crecimiento de tipo epidérmico humano (HER2-)⁸⁷. Asimismo, esta línea celular expresa la proteína caspasa-3 activa⁸⁸, pero el gen *p53* está mutado⁹⁰.

BT-474 (ATCC® HTB-20™). Es una línea celular establecida procedente de un adenocarcinoma humano de mama. Estas células no expresan el receptor para estrógenos (ER-), pero sí los receptores para progesterona (PR+) y del factor de crecimiento de tipo epidérmico humano (HER2+)⁸⁷. Además, esta línea celular expresa la proteína caspasa-3 activa⁸⁸, pero el gen *p53* está mutado⁹⁰.

SK-BR-3 (ATCC® HTB-30™). Se trata de una línea celular establecida procedente de un adenocarcinoma humano de mama. Estas células no expresan los receptores para estrógenos (ER-), ni progesterona (PR-), pero sí el receptor del factor de crecimiento de tipo epidérmico humano (HER2+)⁸⁷. Asimismo, esta línea celular expresa la proteína caspasa-3 activa⁸⁸, pero el gen *p53* está mutado⁹⁰.

MCF-10A (ATCC® CRL-10317™). Se trata de una línea celular establecida procedente de tejido epitelial no tumoral humano de mama. Estas células no expresan los receptores para

estrógenos (ER-), ni progesterona (PR-) ni del factor de crecimiento de tipo epidérmico humano (HER2-)⁸⁷. Asimismo, esta línea celular expresa la proteína caspasa-3 activa⁸⁸, y el gen *p53* no está mutado⁹¹.

En la *Tabla 6*, se han recogido las características génicas de las líneas celulares establecidas, procedentes de adenocarcinomas de mama que se han empleado en el presente estudio.

Tabla 6.- Perfil génico de las diferentes líneas celulares establecidas de mama humanas.

Línea celular establecida	ER	PR	HER2	Caspasa-3	Gen <i>p53</i> mutado
MC-7	+	+	-	No	No
MDA-MB-231	-	-	-	Sí	Sí
BT-474	-	+	+	Sí	Sí
SK-BR-3	-	-	+	Sí	Sí
MCF-10A	-	-	-	Sí	No

Las células se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco’s modified Eagle’s medium) o MacCoy’s 5A Modificado, en el caso de la línea SK-BR-3, con 50 unidades ml⁻¹ de penicilina, 50 µg ml⁻¹ de estreptomina y suplementado con un 10% de suero fetal bovino (*fetal bovine serum*, FBS). Tanto los medios, como los antibióticos y el suero fueron proporcionados por Gibco (Paisley, Reino Unido). En el caso de las células MCF-10A, el medio de cultivo fue DMEM/F12 con 50 unidades ml⁻¹ de penicilina, 50 µg ml⁻¹ de estreptomina y suplementado con 5% de suero de caballo, 0.1% de insulina, 0.2% de hidrocortisona y 0.01% del factor de crecimiento epidérmico y de la toxina del cólera. Todo fue suministrado por Sigma-Aldrich (St Louis, EE UU). Y fueron esterilizados mediante filtrado (0.22 µm de poro, Merck Millipore; Billerica, EE UU).

Los cultivos se mantuvieron en un incubador (Steri-Cult 200, Hucoa-Erloss; Madrid, España) a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂ y un 90% de humedad relativa. Para los experimentos, las células fueron mantenidas en frascos de 25 cm² de superficie (Corning Life Science; Nueva York, EE UU) y sembradas en placas de 6, 24 o 96 pocillos (Falcon; Nueva Jersey, EE UU). Para algunos experimentos, las células se sembraron sobre cubreobjetos estériles cuadrados de 10 mm de lado (Menzel-Gläser; Brunswick, Alemania), situados previamente sobre cada pocillo. Estos cubreobjetos fueron esterilizados con etanol (Panreac Química; Montcada i Reixac, España) en un mechero Bunsen. El resto del material estéril fue de plástico desechable (Corning Life Science). Se trabajó en una cabina estéril de flujo laminar vertical.

Los tratamientos se llevaron a cabo 3 días después de la siembra, cuando las células se encontraban en fase exponencial, con una confluencia aproximada del 40-50% o 70-80%, dependiendo de la duración del experimento programado.

3. Cultivos primarios

En el presente trabajo de investigación también se han empleado cultivos primarios de muestras extraídas de pacientes con cáncer de mama. Se realizó en el laboratorio de investigación del Prof. R. Clarke en el Hospital Christie de Manchester (Reino Unido). Concretamente, estas muestras procedían de una efusión pleural de una paciente con cáncer de mama metastásico. Este cultivo primario fue seleccionado por presentar un perfil génico similar al de la línea celular establecida MDA-MB-231, es decir, era triple negativo.

Las siglas empleadas para nombrar a estas células fue: **BB3RC79**, que corresponden a las iniciales siguientes: BB: Breast Biology; 3: muestra metastásica; RC: Robert Clarke; 79: número de la muestra. Estas células no expresaban los receptores para estrógenos (ER-), ni progesterona (PR-) ni del factor de crecimiento de tipo epidérmico humano (HER2-).

Las células se cultivaron en medio DMEM suplementado con un 10% FBS, un 1% de L-glutamina (Gibco), 0.1% de insulina, 0.2% de hidrocortisona y 0.01% del factor de crecimiento

epidérmico. El medio de cultivo suplementado fue esterilizado mediante filtración (0.2 μm de poro, Thermo Scientific; Waltham, EE UU).

Los cultivos se mantuvieron en un incubador CO_2 SANYO (SANYO Electric Biomedical Co., Ltd.; Osaka, Japan) a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO_2 y un 90% de humedad relativa. Para los experimentos, un total de 600.000 células por pocillo fueron sembradas en placas de 6 pocillos sin cubreobjetos. Los ensayos comenzaron al día siguiente de la siembra.

4. Internalización de las nanopartículas

Para analizar la entrada de las NPMs, las células HeLa, MCF-7, MDA-MB-231 y BT-474 crecieron sobre cubreobjetos y se incubaron durante distintos intervalos de tiempo (0.5 - 24 h) con diferentes concentraciones de nanopartículas (0.05, 0.1 y 0.5 mg Fe ml^{-1} en medio de cultivo). Después de la incubación, las células se lavaron tres veces con tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline*, PBS) o con medio de cultivo, e inmediatamente se observaron en microscopía de campo claro.

Para evaluar la entrada de las NPMs y de la doxorubicina en el interior de las células MDA-MB-231, éstas se cultivaron sobre cubreobjetos y se incubaron durante 24 h con las tres formulaciones de inmovilización covalente de la DOX a la concentración indicada. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron dos lavados con medio de cultivo y las células fueron observadas directamente en microscopía de campo claro y fluorescencia a los distintos tiempos de post-incubación (0, 24, 48 y 72 h).

Previamente, las muestras se observaron en el microscopio invertido (Leica Dmi1 Led; Solms, Alemania) para realizar un análisis global de su morfología, permitiendo descartar que los resultados obtenidos en análisis posteriores pudieran ser debidos a defectos en los cultivos (principalmente contaminación por microorganismos).

5. Tinción con azul de Prusia

Para confirmar la localización y distribución de las diferentes nanopartículas magnéticas, incluyendo las revestidas de bismuto y los nanrods, en el interior de las células en cultivos 2D, se realizó la tinción de Perls o azul de Prusia (una reacción específica para la detección de hierro), que está basada en la liberación de iones férricos en solución clorhídrica, que a su vez reaccionan con ferrocianuro potásico, dando lugar a un precipitado azulado de ferrocianuro férrico⁹². Para ello, las células sembradas sobre cubreobjetos se incubaron con las distintas muestras, con concentraciones desde 0.05 a 0.5 mg Fe ml⁻¹ y con distintos tiempos de incubación (24, 48 y 72 h) y de post-incubación (0, 24, 48 y 72 h). A continuación, los cubreobjetos se fijaron en metanol (Panreac Química) frío durante 5 min y se dejaron secar al aire. Después, se tiñeron durante 15 min con una mezcla (en proporción 1:1) de ferrocianuro potásico al 4% en agua destilada y HCl al 4% en agua destilada. Luego, se realizaron lavados con agua destilada y se contratiñeron con rojo neutro al 0.5% en agua destilada durante 2 min. Finalmente, se lavaron los cubreobjetos hasta eliminar el exceso de colorante y se dejaron secar al aire. Todos los reactivos fueron proporcionados por Panreac Química. Finalmente, las preparaciones se montaron en portaobjetos (Menzel-Gläser) con una gota de DePex (Serva; Heidelberg, Alemania).

Asimismo, utilizando este mismo protocolo, las secciones de las mamoesferas con los diferentes tratamientos incluidas en parafina, fueron desparafinadas y teñidas con la tinción azul de Prusia. Un protocolo más detallado del proceso de inclusión y desparafinado de las muestras se ha recogido en el apartado 14.2.

6. Cuantificación de hierro en el interior de las células

La evaluación de la cantidad de hierro contenida en el interior de las células se llevó a cabo mediante el ensayo colorimétrico de la ferrocina que forma un complejo con el ión ferroso que tiene una alta absorbancia a 550-570 nm⁹³. Para ello, las células HeLa y MCF-7 sembradas en placas de 24 pocillos, se incubaron con los distintos tipos de NPMs a diferentes concentraciones (desde 0.05 a 0.5 mg Fe ml⁻¹) durante 24 h. En el caso de las células MCF-7, también se cuantificó la cantidad de hierro acumulada a las 48 h de incubación y a las 48 h de post-incubación. Transcurridas esas 24 o 48 h, las

muestras se lavaron con PBS frío, se retiró el PBS y se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 h. A continuación, se añadieron 500 μl de 50 mM de NaOH (Panreac Química) en una cámara húmeda sobre un agitador durante 2 h. Luego, se alicuotaron los 500 μl de las células lisadas en un eppendorf, se mezclaron con 500 μl de 10 mM de HCl y 500 μl de la mezcla (1.4 M de HCl y 4.5% de KMnO_4 (Merck; Darmstadt, Alemania) en agua, 1:1), preparada en el momento, y se incubaron a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 h. Posteriormente, se dejaron a temperatura ambiente y se le añadió a cada eppendorf 150 μl de la mezcla de detección de hierro (6.5 mM de ferrocina (Sigma-Aldrich), 6.5 mM de neocuprina (Sigma-Aldrich), 2.5 M de acetato amónico (Panreac Química) y 1M de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich) en agua), preparada en el momento, durante 30 min. Por último, se midió la absorbancia en un lector de placas (Tecan spectrophotometer; Haverhill, Suiza) a 570 nm.

Para calcular la cantidad de hierro acumulado en cada célula, el número de células fue determinado, siguiendo el protocolo que se comenta en el apartado 13.2.

7. Localización subcelular

La identificación de la localización específica de las nanopartículas en el interior de las células HeLa, MCF-7, MDA-MB-231 y BT-474 se llevó a cabo con la sonda fluorescente LysoTracker® Red DND-99 (Molecular Probes; Oregón, EE UU), utilizada específicamente para la tinción y seguimiento para orgánulos ácidos (endosomas tardíos/lisosomas), a una concentración de 50 nM en medio de cultivo a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min. Para ello, las células se preincubaron con las diferentes nanopartículas magnéticas durante 24 h. A continuación, se lavaron en medio completo y se observaron directamente en microscopía de campo claro y de fluorescencia para visualizar las nanopartículas internalizadas y la emisión del LysoTracker® Red DND-99, respectivamente.

8. Análisis de los mecanismos de entrada de las NPs en las células

8.1. Microscopía óptica: incubación a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$

La identificación del mecanismo de entrada de las NPMs en el interior de las células se llevó a cabo mediante el protocolo utilizado habitualmente descrito para otras nanopartículas⁹⁴. Células

sembradas sobre cubreobjetos se incubaron de forma paralela con las diferentes NPs ($0.5 \text{ mg Fe ml}^{-1}$) a 4°C y a 37°C durante 3 h. A continuación, los correspondientes cubreobjetos se fijaron en metanol frío durante 5 min y se dejaron secar al aire. Posteriormente, se tiñeron siguiendo el protocolo del azul de Prusia, descrito anteriormente en el apartado 5.

8.2. Microscopía electrónica de transmisión

Las células HeLa, MCF-7 y MCF-10A fueron sembradas en cubreobjetos, incubadas con las diferentes NPMs a los tiempos de incubación establecidos, lavadas con PBS y tratadas con una mezcla de 2% de formaldehído (Ultra Pure EM Grade, Polysciences Inc.; Philadelphia, EE UU) y 2.5% de glutaraldehído (EM Grade, TAAB Laboratories Equipment Ltd.; Berks, Reino Unido) en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, fueron lavadas con PBS y agua destilada, post-fijadas durante 45 min con OsO_4 (TAAB Laboratories Equipment Ltd.) en PBS y lavadas con agua destilada. Luego, fueron tratadas durante 45 min con 1% de una solución acuosa de acetato uracilo (Electron Microscopy Sciences; Hatfield, EE UU), lavadas y deshidratadas con concentraciones crecientes (50, 75, 95 y 100%) de etanol (Merck KGaA; Darmstadt, Alemania), consecutivamente. Finalmente, las muestras fueron incluidas en resina epon 812 (TAAB Laboratories Equipment Ltd.) en cápsulas de gelatina (Electron Microscopy Sciences). La resina epon fue polimerizada dos días a 60°C y luego despegada de los cubreobjetos por sucesivas inmersiones en nitrógeno líquido y agua caliente. Secciones ultrafinas (70 nm) de las muestras fueron obtenidas mediante un ultramicrotomo Leica Ultracut UCT (Wetzlar, Alemania), transferidas a una gradilla Nickel EM (Gilder; Lincolnshire, Reino Unido) y teñidas con una solución acuosa de acetato uracilo al 3% durante 10 min, seguidas de un lavado con tampón citrato (Electron Microscopy Science) durante 2 min. Las secciones se visualizaron en un microscopio electrónico JEOL JEM 1200 EXII a 100 Kv (JEOL Ltd.; Tokyo, Japón) usando una cámara Gatan Erlangshen ES 1000W (Pleasanton, EE UU).

9. Estudios morfológicos

9.1. Microscopía óptica: tinción con rojo neutro

La morfología general de las células se analizó mediante la tinción con el colorante rojo neutro. Las células HeLa, MCF-7, MDA-MB-231, BT-474 y MCF-10A fueron sembradas sobre cubreobjetos y se incubaron con las diferentes NPMs a la mayor concentración ($0.5 \text{ mg Fe ml}^{-1}$) durante 24 h. A continuación, los cubreobjetos con las células se lavaron con PBS, se fijaron en metanol frío durante 5 min, se dejaron secar al aire y se tiñeron 2 min con rojo neutro al 0.5%. Finalmente, se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de colorante, se dejaron secar al aire y se montaron en un portaobjetos con una gota de DePeX.

9.2. Microscopía óptica: tinción con Hoechst-33258

Para visualizar la morfología del núcleo se utilizó la tinción con el fluorocromo específico para ADN, Hoechst-33258. Las células HeLa, MCF-7, MDA-MB-231, BT-474 y MCF-10A se incubaron 24 h con cada tipo de NPMs a la mayor concentración ($0.5 \text{ mg Fe ml}^{-1}$). A continuación, los cubreobjetos sobre los que se habían sembrado las células se lavaron con PBS, se fijaron en metanol frío durante 5 min, se dejaron secar al aire y se tiñeron 3 min con Hoechst-33258 (Sigma-Aldrich; $5 \mu\text{l ml}^{-1}$ en agua destilada). Posteriormente, se lavaron con agua destilada, se dejaron secar y se montaron en un portaobjetos con una gota de DePeX.

9.3. Microscopía óptica: tinción de secciones de mamosferas con hematoxilina-eosina.

La morfología de las células que formaban las mamosferas, que habían sido tratadas con con nanopartículas magnéticas DMSA sin funcionalizar (MNP) y funcionalizas con DOX (MNP-I-DOX), fue evaluada mediante la tinción con hematoxilina-eosina (H-E). Las secciones de los diferentes tratamientos fueron desparafinadas y teñidas con Hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich), al 40% durante 10 min, lavadas con agua y contrateñidas con eosina amarilla (Merck) al 1% durante 10 sec. Posteriormente, fueron deshidratadas y montadas en DePex. Un protocolo más detallado del proceso de inclusión y desparafinado de las muestras se ha recogido en el apartado 14.2

9.4. Microscopía electrónica de barrido

La morfología externa de las células HeLa incubadas con distintos tipos de nanopartículas fue analizada en microscopía electrónica de barrido. Para ello, las células se incubaron con las diferentes NPMs a $0.1 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ durante 3 h. A continuación, los cubreobjetos se fijaron con glutaraldehído al 3% en PBS durante 1 h, se lavaron con agua Milli-Q™ y después se fijaron en OsO_4 al 1% en PBS durante 1 h. Posteriormente, se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol: 30, 50, 70, 90 y 100%, esta última tres veces durante 5 min. Las muestras en etanol absoluto, se mantuvieron a 4°C hasta llevarlas al equipo para realizar el punto de secado crítico para su recubrimiento con oro. La captura de imágenes se realizó en un microscopio electrónico de barrido Philips XL 30 Dx4i (Eindhoven, Holanda) perteneciente al Servicio Interdepartamental de Investigación (SIdI) de la UAM.

10. Análisis del citoesqueleto y proteínas de adhesión

10.1. Inmunofluorescencia indirecta para α -tubulina

La organización y distribución de los microtúbulos (abreviadamente, MTs) se analizó mediante una inmunofluorescencia indirecta para α -tubulina. Para ello, las células HeLa, MCF-7, MDA-MB-231 y BT-474 sembradas sobre cubreobjetos fueron incubadas con las distintas muestras a la mayor concentración ensayada ($0.5 \text{ mg Fe ml}^{-1}$). Este ensayo se realizó a las 24, 48 y 72 h de incubación o bien, a las 72 h de finalizar el tratamiento. A continuación, las muestras se fijaron en metanol frío durante 5 min, se lavaron 2 min con agua destilada, 5 min con PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 (Sigma-Aldrich; al 0.5% en PBS) durante 5 min. Posteriormente, las muestras se incubaron con el anticuerpo primario monoclonal anti α -tubulina de ratón (Sigma-Aldrich; dilución 1:100 en PBS) durante 45 min a 37°C en una cámara húmeda. Tras la incubación, se lavaron 5 min con PBS, se volvieron a permeabilizar 5 min con Tritón X-100 y se procedió a la incubación con anticuerpo secundario policlonal anti-ratón unido a Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes; dilución 1:100 en PBS) durante 45 min en cámara húmeda a 37°C . Después de ser lavadas con PBS, se realizó una contratinción del núcleo con Hoechst-33258 durante 3 min. Finalmente, las muestras se lavaron 5 min con PBS y se montaron sobre portaobjetos con una gota de ProLong (Molecular Probes).

El índice mitótico (% de células en división, IM) se evaluó mediante el recuento de las muestras control y tratadas en microscopía de fluorescencia, para obtener datos cuantitativos. Cada valor fue obtenido después de recontar un mínimo de 1000 células.

10.2. Inmunofluorescencia indirecta para vinculina + marcaje con faloidina

El análisis de la distribución de la proteína de adhesión: vinculina y de la organización de los filamentos de actina (abreviadamente, actina-F) se realizó mediante inmunofluorescencia indirecta para vinculina y un marcaje con faloidina-Alexa Fluor® 555. Para ello, las células HeLa, MCF-7, MDA-MB-231 y BT-474 se incubaron con las diferentes NPMs a la mayor concentración ensayada (0.5 mg Fe ml⁻¹) y el inmunomarcaje se realizó a las 24, 48 y 72 h de incubación o 72 h de post-incubación. A continuación, los cubreobjetos con las células se fijaron 20 min en formol-PBS (Panreac Química; 1:10) a 4 °C, se lavaron 5 min con PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.5% en PBS durante 5 min. Después, se incubaron, primero con la solución bloqueante (albúmina de suero bovino al 5%, FBS al 5%, Triton X-100 al 0.02% en PBS) durante 30 min, y posteriormente, con el anticuerpo primario anti-vinculina de ratón (Sigma-aldrich; dilución 1:50 en solución bloqueante) durante 1 h a 37 °C en una cámara húmeda. Las muestras se lavaron 5 min con PBS, se permeabilizan 5 min con Tritón X-100 al 0.5% en PBS y luego, se incubaron 1 h con el anticuerpo secundario policlonal anti-ratón unido a Alexa-Fluor® 488 (dilución 1:50 en solución bloqueante), también en una cámara húmeda. A continuación, se permeabilizaron 5 min con Tritón X-100 al 0.5%, y se incubaron con faloidina conjugada con Alexa Fluor® 555 (Molecular Probes; dilución 1:200 en PBS) durante 25 min a 37 °C en una cámara húmeda. Finalmente, se lavaron 5 min con PBS, se contratiñeron 3 min con Hoechst-33258, se volvieron a lavar tres veces con PBS durante 5 min y se montaron sobre portaobjetos con una gota de Prolong.

11. Análisis del ciclo celular

La citometría de flujo se utilizó para realizar un análisis del contenido en ADN de las células, estimando así, la distribución de las fases del ciclo celular en las distintas muestras. El fluorocromo utilizado fue el ioduro de propidio, que se intercala entre los pares de bases del ADN. La intensidad

de fluorescencia será proporcional a la cantidad de fluorocromo intercalado, y por lo tanto, a la cantidad de ADN de la célula.

Para ello, las células HeLa, MCF-7, MDA-MB-231, BT-474 y SK-BR-3 sembradas directamente sobre los pocillos, se incubaron con las distintas NPMs durante 24 h. A continuación, se lavaron las células, se tripsinizaron y se centrifugaron a 1200 rpm durante 3 min. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento con 100 μl de medio de cultivo sin rojo fenol. Se añadieron 50 μl del Kit coulter DNA Prep Reagents (Beckman-Coulter Inc.; California, EE UU) y 1 ml de ioduro de propidio (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) con ARNasa (Sigma-Aldrich). Después, se agitó y se incubó durante 30 min a 37 °C en oscuridad. Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo Coulter Epics XL-MCL (Beckman-Coulter Inc.) con un láser de excitación de 488 nm, en el servicio de citometría de flujo del CNB-CSIC.

12. Detección de estrés oxidativo

Los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno generadas después de la incubación con las NPMs fueron evaluados cualitativamente mediante el ensayo del diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DA-DCFH). La molécula de DA-DCFH es capaz de atravesar la membrana celular y, una vez en el interior, es sustrato de una esterasa que cataliza su desacetilación (DA-DCFH \rightarrow DCFH). En este estado reacciona con las especies reactivas de oxígeno generadas dando lugar a un compuesto fluorescente (DCFH \rightarrow DCF)⁹⁵.

Las células HeLa, MCF-7, MDA-MB-231, BT-474 y MCF-10A crecieron sobre cubreobjetos y se incubaron con las nanopartículas a la mayor concentración (0.5 mg Fe ml^{-1}) durante 24, 48 y 72 h. Como control positivo del experimento, las células se incubaron 1 h con 400 μM de H_2O_2 (HeLa), con 800 μM de H_2O_2 durante 1 h 30 min (MCF-7 y MDA-MB-231) o 1 h con 800 μM de H_2O_2 (BT-474). En todos los casos, las muestras se lavaron con medio de cultivo y se incubaron con la sonda DA-DCFH (Sigma-Aldrich) a una concentración de 10 μM durante 30 min. Transcurrido este tiempo, las muestras se lavaron en medio sin rojo fenol y se visualizaron inmediatamente en microscopía óptica de campo claro y fluorescencia.

13. Ensayos de viabilidad celular

13.1. Ensayo del MTT

El ensayo colorimétrico del MTT (bromuro de metiltiazolildifenil-tetrazolio), está basado en la formación de formazán, que tiene un color púrpura, en las células vivas por la actividad de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa⁹⁶. Para realizar este test, las células HeLa, MCF-7, MDA-MB-231, BT-474 y MCF-10A sembradas en placas de 24 pocillos, se incubaron con los distintos tipos de NPMs, las NPs revestidas de bismuto y los nanorods analizados a la concentración más elevada ($0.5 \text{ mg Fe ml}^{-1}$) durante 24 h. Transcurridas 24 h después de finalizar la incubación, se añadieron 0.5 ml de MTT (a cada pocillo) a una concentración final de $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ en medio completo. Las células permanecieron en el incubador durante 3 - 4 h. Pasado ese tiempo, los precipitados de formazán se disolvieron añadiendo 0.5 ml de dimetilsulfóxido (DMSO; Panreac Química) a cada pocillo y la densidad óptica se midió a 542 nm en un lector de placas (Tecan Spectrophotometer). La supervivencia celular fue expresada como el porcentaje de absorción de las células tratadas (incubadas con NPs), en relación con el de las células control (células no incubadas), teniendo en cuenta que se sembraron el mismo número de células, en las placas control y en las tratadas:

$$\% \text{ supervivencia} = (\text{D.O. células tratadas} / \text{D.O. células control}) \times 100$$

Mediante este mismo ensayo también se evaluó la supervivencia de las células calentadas en un baño térmico de agua (P-Selecta; España) a 37 y 44 °C durante 1 h.

13.2. Test del azul Tripán

El azul Tripán es un colorante vital utilizado para el recuento de la viabilidad celular ya que no es incorporado por las células vivas (permanecen refringentes), pero se acumula en las células que han perdido la integridad de la membrana plasmática (teñidas de azul), y que por lo tanto, se consideran no viables⁹⁷. Para este ensayo, las células HeLa, MCF-7 y MDA-MB-231 sembradas en placas de 24 pocillos, se incubaron con las distintas NPMs a la concentración más elevada ensayada ($0.5 \text{ mg Fe ml}^{-1}$) durante 24 h. Transcurrido este tiempo, las células fueron lavadas con PBS o medio de cultivo y se llevó a cabo el recuento del número de células en 3 pocillos diferentes. A las células tripsinizadas se le añadió azul Tripán (Sigma-Aldrich; 0.4% peso/volumen).

La viabilidad celular se calculó haciendo un recuento en un hemocitómetro mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ supervivencia} = \text{células vivas} / \text{células totales (vivas + muertas)} \times 100$$

Mediante este mismo ensayo se procedió al recuento del número de células para los experimentos de cuantificación de la entrada de NPs. El número total de células de cada muestra, se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Total de células} = \text{media del recuento} \times \text{factor dilución} \times 10^4 \times \text{número de ml}$$

14. Identificación de la muerte celular por la ruta apoptótica mitocondrial

14.1. Inmunofluorescencia indirecta para Bax

La distribución subcelular de la proteína proapoptótica Bax se analizó mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta en células que recibieron un tratamiento de hipertermia. Para ello, las células HeLa fueron calentadas en un baño térmico a 44 °C durante 1 h y con un tiempo de post-incubación de 48 h. A continuación, se fijaron en formol-PBS (1:10) durante 20 min a 4 °C, se lavaron 5 min con PBS y se permeabilizaron 5 min con Tritón X-100 al 0.5% en PBS. Posteriormente, se incubaron con la solución bloqueante durante 30 min y luego, con el anticuerpo primario anti-Bax de ratón (Sigma-Aldrich; dilución 1:100 en solución bloqueante) durante 1 h a 37 °C en una cámara húmeda. Después, las células se lavaron 5 min con PBS, se permeabilizan 5 min con Tritón X-100 al 0.5% en PBS y se incubaron 1 h con el anticuerpo secundario policlonal anti-ratón unido a isotiocianato de fluoresceína (ICTF) (Sigma-aldrich; dilución 1:50 en solución bloqueante). Finalmente, se lavaron con PBS, se contratiñeron 3 min con Hoechst-33258, se volvieron a lavar con PBS y se montaron sobre un portaobjeto con una gota de Prolong.

14.2. Inmunofluorescencia indirecta para citocromo C

El estudio de la relocalización subcelular del citocromo C que ocurre cuando se desencadena la apoptosis por la vía mitocondrial, se realizó mediante una inmunofluorescencia indirecta para citocromo C en las secciones de las mamoesferas, lo que exigió la realización de un largo

procesamiento que se llevó a cabo en distintos laboratorios. Brevemente, se realizaron los siguientes protocolos. En primer lugar se incluyeron las muestras de las diferentes muestras de mamoesferas en bloques de parafina. Para ello, las mamoesferas fueron recogidas y centrifugadas 2 min a 360 rpm, el sobrenadante fue retirado y el sedimento se fijó en 1 ml de formalina (Sigma-Aldrich) durante 10 min. A continuación, las muestras fueron centrifugadas 2 min a 360 rpm, el sobrenadante fue decantado y se añadieron 100 μ l de PBS. Posteriormente, las muestras se llevaron al Servicio de Histología del Hospital Christie de Manchester para su inclusión en parafina.

El segundo paso fue realizar los cortes de los diferentes bloques de parafina en el Servicio de Histología de CNB-CSIC. El procesamiento posterior, se llevó a cabo en el laboratorio del Dpto. de Biología de la UAM, y consistió en desparafinar los cortes introduciéndolos en xilol (Panreac Química) durante 15 min y posteriormente, en concentraciones decrecientes de etanol (100% durante 10 min, 96% durante 5 min y 70% durante 5 min) y en agua destilada durante 5 min. A continuación, las muestras se permeabilizaron 5 min con Tritón X-100 al 0.5% en PBS. Luego, se incubaron, primero con la solución bloqueante durante 30 min y después, con el anticuerpo primario anti-citocromo C de ratón (Molecular Probes; dilución 1:25 en solución bloqueante) durante 1 h a 37 °C en una cámara húmeda. Posteriormente, las muestras se lavaron 5 min con PBS, se permeabilizaron 5 min con Tritón X-100 al 0.5% en PBS y se incubaron 1 h con el anticuerpo secundario policlonal anti-ratón unido a Alexa Fluor 488® (dilución 1:100 en solución bloqueante). Finalmente, las muestras se lavaron 5 min con PBS, se contratiñeron 3 min con Hoechst-33258, se volvieron a lavar con PBS y se montaron con una gota de Prolong en un portaobjetos.

14.3. Inmunofluorescencia indirecta para caspasa-3 activa

El estudio de la detección de la caspasa-3 (ejecutora) activa se realizó mediante una inmunofluorescencia indirecta para la misma. Se utilizaron similares condiciones a las descritas en el apartado anterior, de modo que el protocolo seguido fue el mismo, excepto la concentración de los anticuerpos: el anticuerpo primario anti caspase-3 activa fue de conejo (Cell Signaling Technology; Danvers, EE UU; dilución 1:250 en solución bloqueante) y el anticuerpo secundario fue un policlonal anti-conejo unido a Alexa 555® (Molecular Probes; dilución 1:500 en solución bloqueante).

15. Formación de mamoesferas primarias

El medio usado para el cultivo de las mamoesferas fue DMEM/12 (Gibco) sin rojo fenol suplementado con un 2% de B27® (que es una mezcla de antioxidantes que no lleva vitamina A) (Invitrogen; Scotland, Reino Unido) y con un 0.01% del factor de crecimiento epidérmico. Las placas de cultivo no adherentes se obtuvieron recubriéndolas con poli (2- hidroxietil metacrilato) (pHEMA; Sigma-Aldrich).

El protocolo seguido fue el siguiente⁹⁸: las células tripsinizadas fueron recogidas y centrifugadas 2 min a 1800 rpm. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 1 - 5 ml de PBS frío. A continuación, esa solución se pasó a través de una aguja de 25 G (TERUMO; Dubai, Emiratos Árabes Unidos) usando una jeringa (TERUMO) 3-5 veces para separar las células y tener una suspensión de células individualizadas. A continuación, se usó un hemocitómetro para confirmar que las células estaban individualizadas y se calculó el número de células viables mediante el ensayo del azul Tripán. Luego, se añadieron 2 ml del medio de cultivo para las mamoesferas en cada pocillo y la suspensión celular a la densidad apropiada. Para las células MDA-MB-231 a 500 células/cm² (5000 células por pocillo en una placa de 6 pocillos). Finalmente, se dejaron en el incubador sin mover ni cambiar el medio durante 5 días y se recontó el número de esferas que tuvieran un tamaño de diámetro mayor a 50 µm usando un microscopio que llevaba incorporado una regla en los oculares.

La eficacia de formación de mamoesferas (*Mammosphere Forming Efficacy*, MFE) fue calculada mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ MFE} = (\text{Número de esferas por pocillo} / \text{Número de células sembradas por pocillo}) \times 100$$

Para llevar este ensayo en las células extraídas de muestras clínicas, se utilizó el mismo protocolo que se acaba de comentar, pero con ligeras modificaciones: las células sólo se pasaron a través de la jeringa un máximo de 3 veces, para evitar dañar a las células y se dejaron en medio de cultivo en el incubador durante 7 días para que se formen las esferas.

16. Calentamiento

Para analizar el posible distinto grado de sensibilidad de las diferentes líneas celulares a un tratamiento de hipertermia intracelular, las células HeLa, MCF-7, MDA-MB-231 y BT-474 fueron calentadas en un baño térmico a 44 °C. Para ello, las distintas líneas celulares crecidas en cubreobjetos, se incubaron 1 h en un baño de agua a 44 °C. Transcurrido ese tiempo, se volvieron a dejar en el incubador durante 24 y 48 h. A las 24 h de post-incubación, las células se fijaron 5 min en metanol frío y se tiñeron con rojo neutro y Hoechst-33258, y también se evaluó la supervivencia celular mediante el ensayo del MTT.

Además, a las 48 h de post-tratamiento térmico, se realizó una inmunofluorescencia indirecta para α -tubulina y para Bax (sólo en las células HeLa). Las células que habían perdido la adhesión al sustrato por el tratamiento y flotaban en el medio de cultivo, se recogieron y se centrifugaron 5 min a 1200 rpm. Posteriormente, se fijaron 5 min en etanol 70% frío y se tiñeron con Hoechst-33258.

17. Aplicación de un campo magnético alterno

Los primeros experimentos de hipertermia intracelular se llevaron a cabo utilizando un prototipo diseñado por el Dr. Rivero del Instituto de Magnetismo Aplicado de la Universidad Complutense de Madrid (IMA-UCM), al inicio de esta Tesis Doctoral. Para ello, se utilizaron las nanopartículas magnéticas recubiertas de aminodextrano, sintetizadas por el grupo de la Dra. Morales del ICMM-CSIC.

Las células HeLa incubadas con nanopartículas AD a 0.5 mg Fe ml⁻¹ durante 3 h, fueron expuestas a un campo magnético alterno de 100 kHz y 150 G durante 30 min. Asimismo, se sometieron al campo magnético alterno células sin preincubar con NPs AD. El análisis de la morfología celular mediante tinción con rojo neutro y Hoechst-33258, se realizó 24 h después de la exposición al campo magnético alterno.

Los siguientes experimentos de hipertermia intracelular se realizaron utilizando otro prototipo de generador de campo magnético alterno, diseñado por el Dr. Terán y el Dr. Bollero pertenecientes al

área de Magnetismo del IMDEA-Nanociencia. Para estos experimentos se utilizaron las NPMs recubiertas de ácido dimercaptosuccínico (DMSA).

Las células HeLa y MDA-MB-231 se incubaron con las nanopartículas revestidas de DMSA a una concentración final de $0.5 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ durante 24 h. A continuación fueron sometidas a un campo magnético alterno de 160 kHz y 420 G durante 15 min (HeLa) o de 204 kHz y 420 G durante 45 min (MDA-MB-231). Como en el caso anterior, también se expusieron al campo magnético alterno células sin incubar con las NPMs y el análisis de la morfología celular se llevó a cabo con las mismas tinciones, después de 24 h de finalizar el tratamiento.

18. Microscopía óptica

Las muestras de los cultivos de células en monocapa (2D) procesadas para microscopía óptica se visualizaron y fotografiaron en un microscopio Olympus BX61 (Tokio, Japón), equipado con una cámara digital Olympus DP50 y una lámpara de fluorescencia con filtros de excitación de: i) 365-395 nm (ultravioleta) para visualizar el Hoechst-33258 de los núcleos; ii) 460-490 nm (azul) para visualizar el Alexa Fluor® 488 de la inmunofluorescencia indirecta para: tubulina, vinculina, citocromo C y Bax. Asimismo, se utilizó este mismo filtro de excitación para la sonda DA-DCFH; y iii) 510-550 nm (verde) para visualizar la doxorrubicina, el LysoTracker Red® y el AlexaFluor 555® del marcaje de los filamentos de actina.

Además, las muestras también se fotografiaron en un microscopio confocal Leica TCS SP2 (Wetzlar, Alemania) usando el láser Helio-Neón que tiene una línea de emisión a 543 nm, para la visualización del LysoTracker Red®.

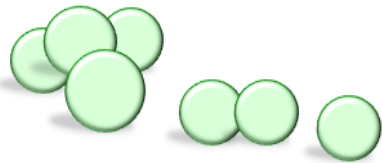
Las muestras de las mamoesferas (cultivos 3D) procesadas para microscopía óptica se visualizaron y fotografiaron en un microscopio Leica DMI3000 B (Wetzlar, Alemania), equipado con una cámara digital Leica DFC310 FX y una lámpara de fluorescencia con filtro de excitación de 510-550 nm (verde) para visualizar la doxorrubicina.

Las imágenes capturadas, fueron procesadas con el programa Adobe PhotoShop 7.0 (Sistemas Adobe; San José, EE UU).

19. Análisis estadísticos

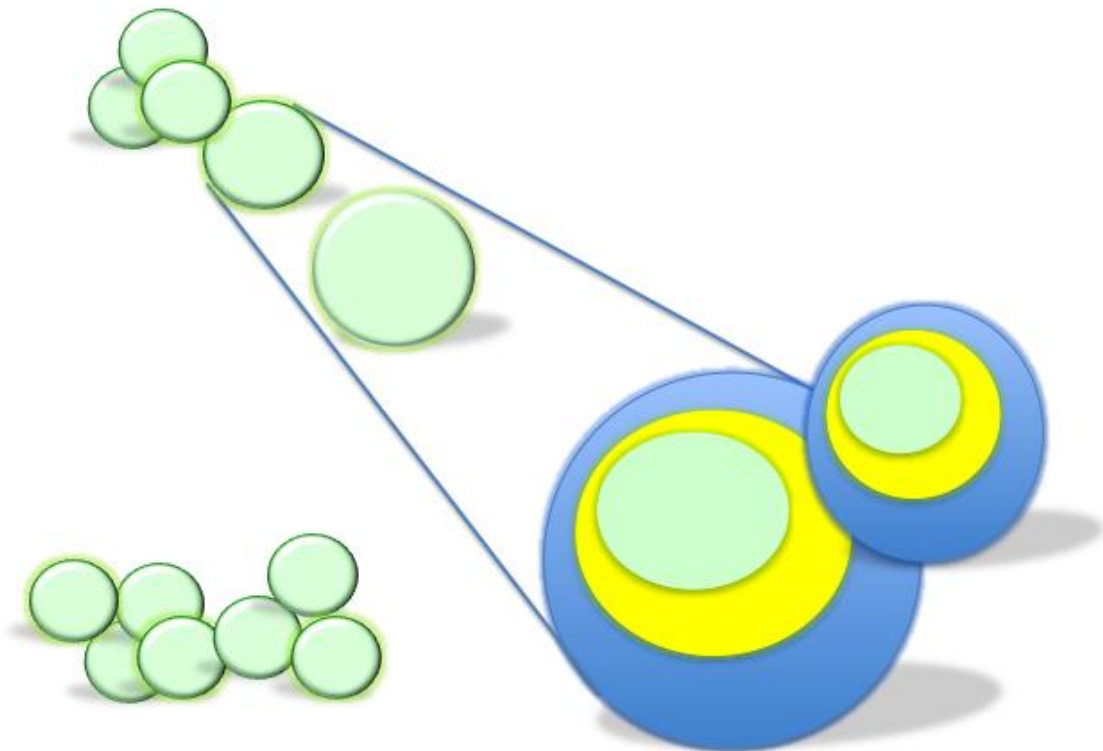
Todos los ensayos se realizaron como mínimo por triplicado y los datos obtenidos fueron expresados como la media \pm las desviación estándar. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa SPSS usando una ANOVA de un factor Bonferroni, y también con un T-student Test, obteniendo el mismo nivel de significancia en ambos casos. El umbral de significación fue $P = 0.05$ y los valores de $P < 0.05$ (*), < 0.01 (**) y < 0.005 (***) se consideraron significativos.

RESULTADOS



Capítulo 1: Nanopartículas magnéticas.

Análisis de la bicompatibilidad



La actividad biológica de los diferentes tipos de NPMs inicialmente seleccionados (AD, DMSA, APS, H y D) fue evaluada en la línea celular establecida HeLa. Una vez que se analizó la internalización, la acumulación y la toxicidad a varias concentraciones y tiempos de incubación, se seleccionaron las nanopartículas recubiertas de DMSA basándose en sus propiedades químicas, físicas y biológicas, para continuar los experimentos en las líneas celulares establecidas procedentes de adenocarcinomas humanos de mama: MCF-7, MDA-MB-231, BT-474 y SK-BR-3, y en una línea no tumoral humana de mama: MCF-10A, al formar parte del Proyecto Europeo Multifun.

1. Caracterización de las nanopartículas magnéticas

Las diferentes nanopartículas magnéticas fueron observadas al microscopio electrónico de transmisión por el grupo de la Dra. Morales del ICM-SCIC. Como se aprecia en la *Figura 23*, las nanopartículas se caracterizaban por una elevada uniformidad en cuanto a su forma y tamaño (entre 6 y 15 nm). La interacción entre las partículas en medio acuoso produjo agregaciones que dieron como resultado un tamaño hidrodinámico por debajo de los 150 nm, lo que les otorgaba unas buenas propiedades coloidales.

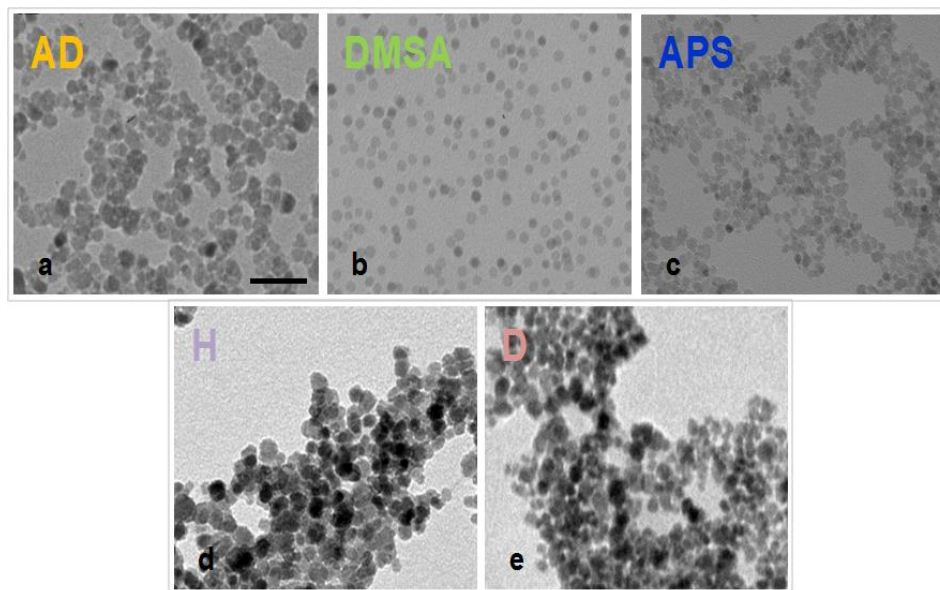


Figura 23.- Imágenes al TEM de los diferentes tipos de nanopartículas magnéticas. (a) AD. (b) DMSA. (c) APS. (d) H. (e) D. Barra de escala: 50 nm. Cedidas amablemente por el grupo de la Dra. Morales.

2. Internalización y acumulación de las NPMs en las células

Las células, previamente incubadas con los distintos tipos de NPMs, fueron lavadas y observadas directamente en microscopía óptica de campo claro -sin ningún tipo de procesamiento- para evitar la formación de posibles artefactos que pudieran interferir en su visualización (ver *Figura 24*).

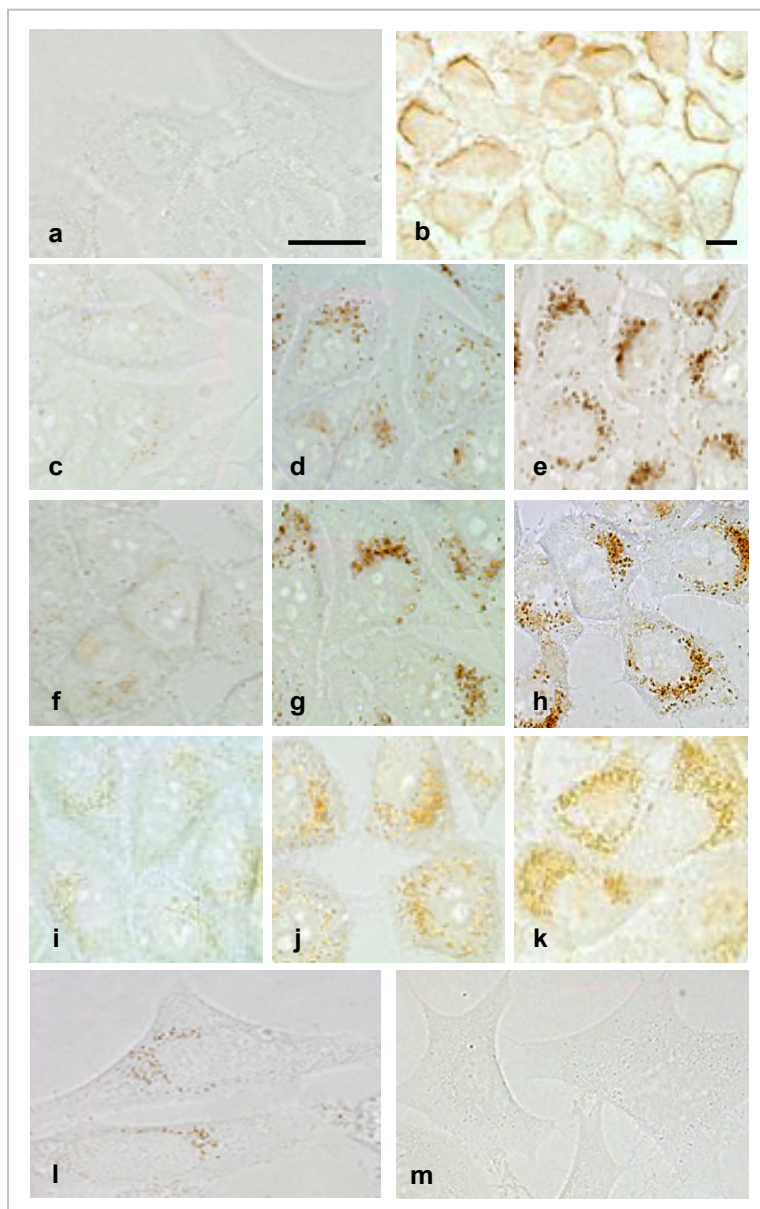


Figura 24.- Imágenes representativas en microscopía de campo claro de la acumulación de los distintos tipos de NPMs en el interior de las células HeLa. (a) Células control. (b) Células incubadas 1 h con NPs AD a 0.1 mg Fe ml⁻¹. (c-e) Células incubadas 24 h con NPs AD a 0.05, 0.1 y 0.5 mg Fe ml⁻¹, respectivamente. (f-h) Células tratadas 24 h con NPs DMSA a 0.05, 0.1 y 0.5 mg Fe ml⁻¹, respectivamente. (i-k) Células incubadas 24 h con NPs APS a 0.05, 0.1 y 0.5 mg Fe ml⁻¹, respectivamente. (l) Células tratadas 24 h con NPs H a 0.5 mg Fe ml⁻¹. (m) Células incubadas 24 h con NPs D a 0.5 mg Fe ml⁻¹. Barra de escala: 10 μm.

Mientras que las NPs AD, DMSA y APS fueron detectadas en el interior de las células en todas las condiciones experimentales ensayadas, las recubiertas de heparina (H) se acumulaban en menor cantidad que las anteriores, y sólo se pudieron observar en el interior de las células cuando la concentración fue de $0.5 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ y el tiempo de incubación 24 h. Asimismo, las NPMs revestidas de dextrano (D) no se visualizaron ni a la concentración más elevada a las 24 h de incubación. La evolución temporal de la entrada de las NPMs fue la siguiente: primeramente, las NPMs se adherían en el exterior de la célula y posteriormente, se iban acumulando en el citoplasma de las células en forma de puntos de color ocre.

Las líneas celulares establecidas procedentes de adenocarcinoma de mama se incubaron únicamente con NPMs revestidas de DMSA, y en algunas de las líneas a diferentes concentraciones: las células MCF-7 y BT-474 a $0.4 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ y las células MDA-MB-231 a 0.1 y $0.4 \text{ mg Fe ml}^{-1}$. Resultados similares a los descritos para las células HeLa se obtuvieron en las tres líneas celulares de mama, si bien la cantidad de nanopartículas DMSA acumuladas en su interior parecía ser algo inferior en relación con las células HeLa (ver *Figura 25*). Las imágenes correspondientes en las líneas MDA-MB-231 y BT-474 a la concentración de $0.4 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ no son mostradas por ser similares a las anteriores.

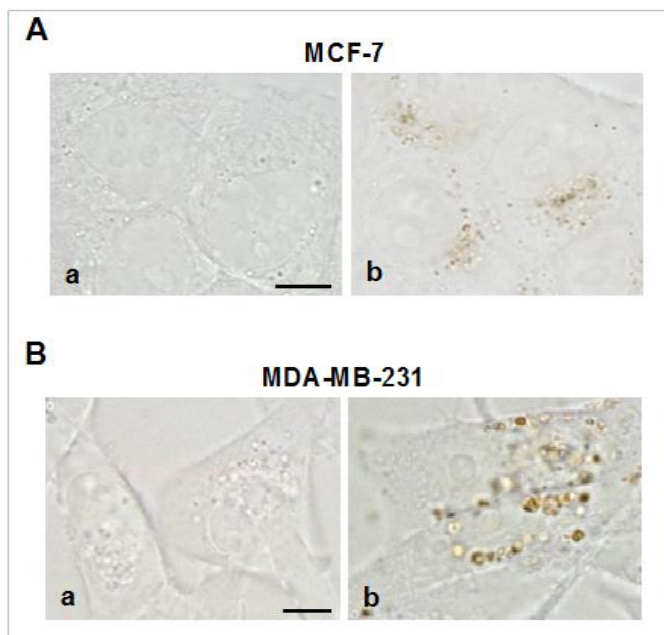


Figura 25.- Imágenes en microscopía de campo claro de NPs DMSA en el interior de las células después de 24 h de incubación. (A) Células MCF-7. (a) Células control; y (b) incubadas con las NPs a $0.4 \text{ mg Fe ml}^{-1}$. Barra de escala: $10 \mu\text{m}$. (B) Células MDA-MB-231 en las mismas condiciones que (B) pero a $0.1 \text{ mg Fe ml}^{-1}$. Barra de escala: $15 \mu\text{m}$.

3. Detección de hierro en el interior de las células

La tinción con azul de Prusia, específica para detectar hierro en el interior de las células, corroboró los resultados obtenidos en células “vivas” (sin fijar ni teñir) en microscopía óptica de campo claro: el grado de acumulación de las nanopartículas magnéticas dependía del tipo de cubierta, así como, de la concentración y del tiempo de incubación de éstas.

Las células HeLa no incubadas con ningún tipo de NPMs y teñidas con azul de Prusia, resultaron negativas para esta tinción, no observándose ningún punto azul en su interior (imagen no mostrada). Sin embargo, como muestra la *Figura 26 (a-i)*, la cantidad de hierro presente en el interior celular aumenta con la concentración de las NPs AD, DMSA y APS utilizadas. De modo que, a una concentración de $0.1 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ todas las células contenían partículas de color azul en su citoplasma.

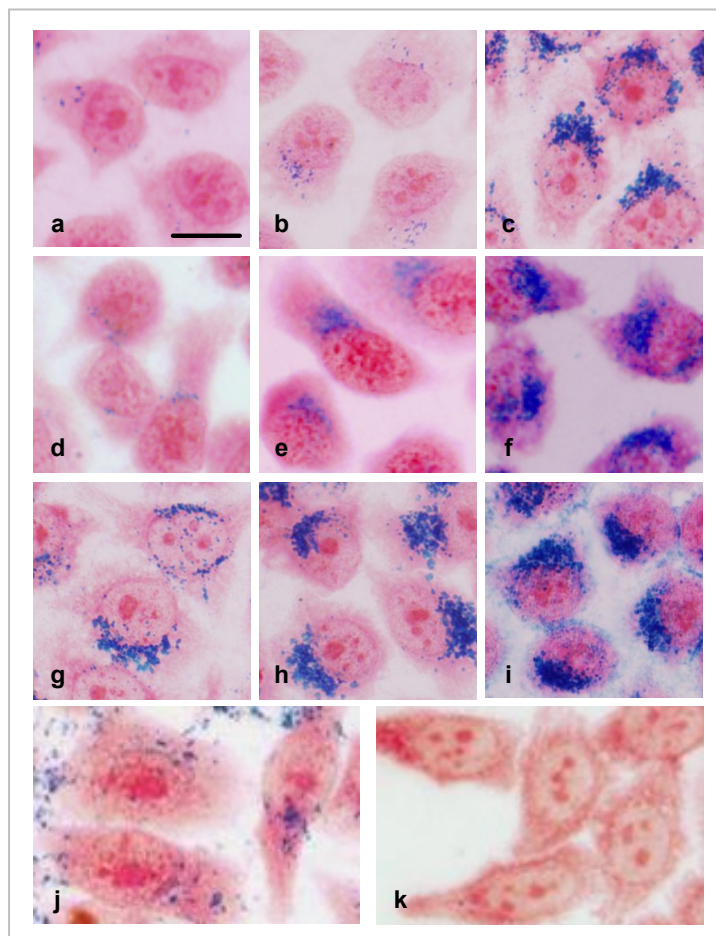


Figura 26.- Células HeLa incubadas durante 24 h con diferentes NPMs y teñidas con azul de Prusia. (a-c) Células incubadas con NPs AD (0.05, 0.1, 0.5 mg Fe ml^{-1} , respectivamente). (d-f) Células tratadas con NPs DMSA (0.05, 0.1, 0.5 mg Fe ml^{-1} , respectivamente). (g-i) Células incubadas con NPs APS (0.05, 0.1, 0.5 mg Fe ml^{-1} , respectivamente). (j) Células tratadas con NPs H a 0.5 mg Fe ml^{-1} . (k) Células incubadas con NPs D a 0.5 mg Fe ml^{-1} . Barra de escala: 10 μm .

Cuando la concentración se elevó a $0.5 \text{ mg Fe ml}^{-1}$, el citoplasma de las células presentaban una elevada cantidad de dichas partículas. La acumulación de las NPMs revestidas de AD (con carga positiva) y de DMSA (con carga negativa) parecía ser muy inferior con respecto a las NPMs recubiertas de APS. Mientras que la entrada de las NPMs revestidas de heparina cargadas negativamente mostró ser claramente inferior a las tres anteriores, y las cubiertas de dextrano (con carga neutra) no mostraron capacidad para internalizarse (ver *Figura 26 (j,k)*).

Asimismo, las células MCF-7 fueron incubadas con NPMs DMSA a $0.4 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ durante diferentes tiempos de incubación (de 0.5 a 72 h). La tinción con azul de Prusia demostró que la internalización de las NPMs en las células en cultivo dependía del tiempo de incubación (ver *Figura 27*). Sin embargo, la entrada de las NPMs al interior celular parecía llegar a un punto de saturación a las 24 h de incubación. Es importante mencionar que, a partir de las 12 h de incubación todas las células presentaban partículas en su citoplasma.

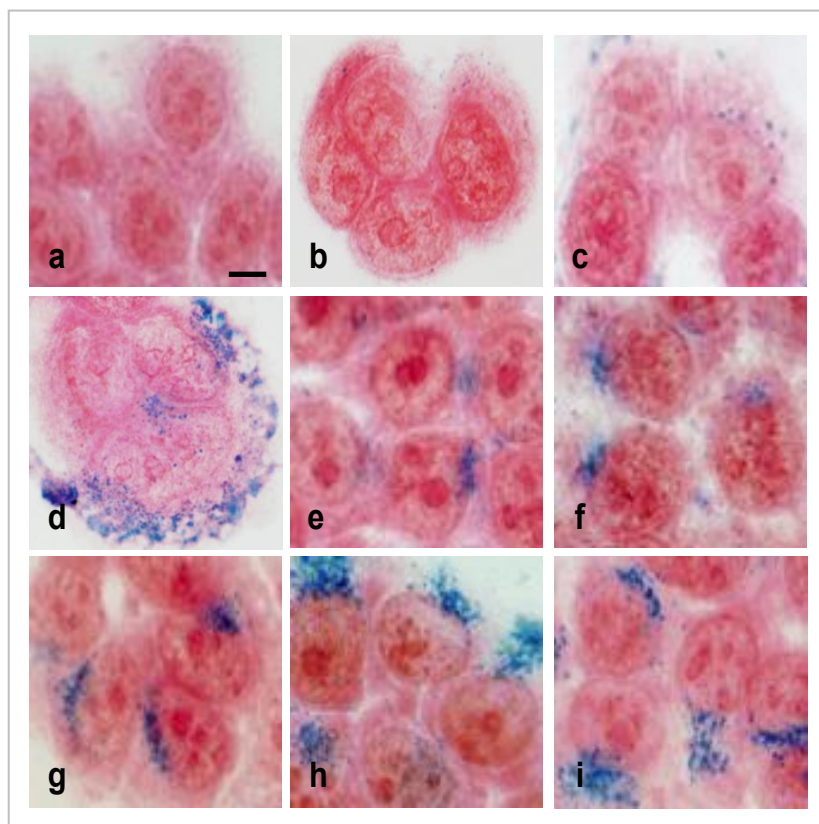


Figura 27.- Células MCF-7 incubadas con NPMs DMSA a $0.4 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ a diferentes tiempos de incubación y teñidas con azul de Prusia. (a) Células control, sin incubar con NPs. (b-i) Células incubadas 0.5, 1, 3, 6, 12, 24, 48 y 72 h, respectivamente. Barra de escala: $10 \mu\text{m}$.

Las demás líneas celulares de mama evaluadas (MDA-MB-231, BT-474 y SK-BR-3) fueron incubadas con NPMs DMSA a diferentes tiempos de incubación y a distintas concentraciones. Los resultados fueron similares a los obtenidos en las células MCF-7 y HeLa. La tinción con azul de Prusia evidenció que la acumulación dependía de la concentración y tiempo de incubación, y que partir de las 24 h de incubación también había una saturación en la entrada de las NPs (*Figura 28*). Sólo se muestran las imágenes de las células MCF-7 y MDA-MB-231.

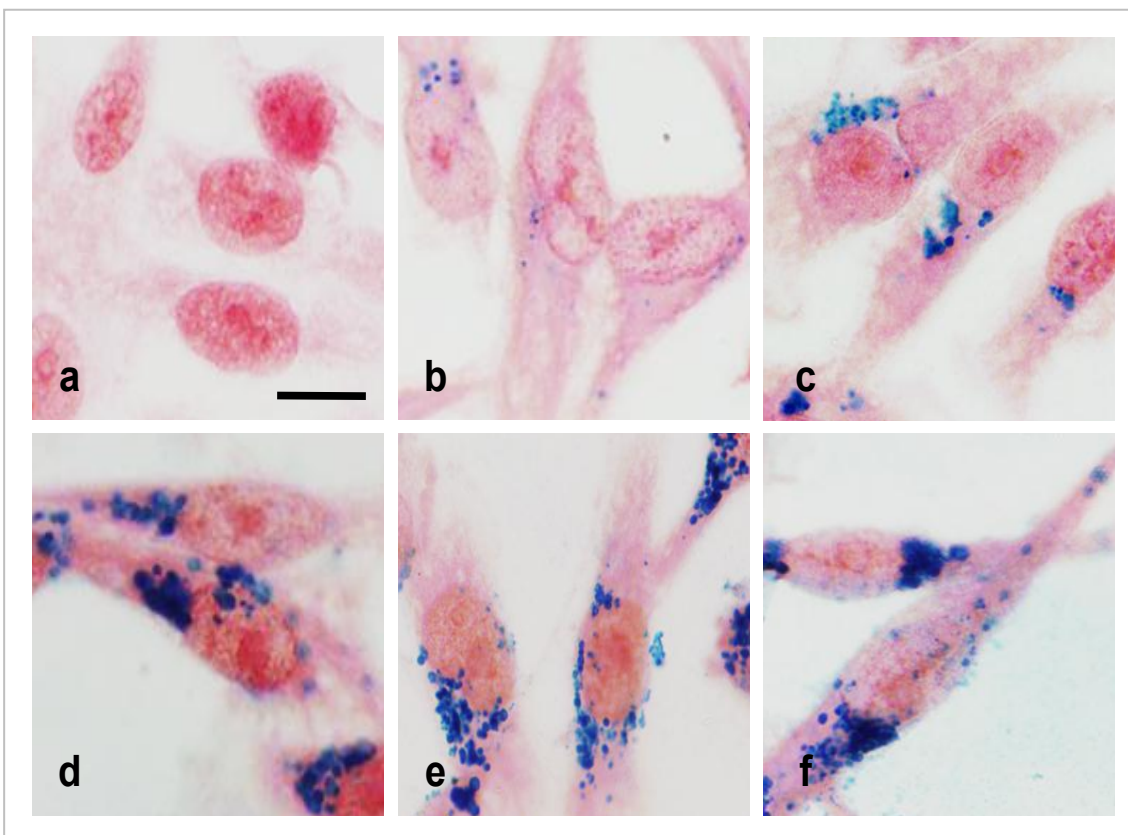


Figura 28.- Células MDA-MB-231 incubadas con NPMs DMSA a distintas concentraciones y tiempos de incubación, y teñidas con azul de Prusia. (a) Células control; (b,c) incubadas durante 24 h a 0.05 y 0.1 mg Fe ml⁻¹, respectivamente; y (d-f) incubadas a 0.4 mg Fe ml⁻¹ durante 24, 48 y 72 h, respectivamente. Barra de escala: 15 μm.

Asimismo, mediante la tinción con azul de Prusia también se analizó el tiempo de permanencia de las NPMs en el interior de las células. Después de 24 h de incubación con NPMs DMSA, éstas fueron eliminadas del medio de cultivo y las células se post-incubaron con medio sin nanopartículas hasta 72 h a 37 °C. Las muestras a 24, 48 y 72 h de post-tratamiento se tiñeron con azul de Prusia y se visualizaron en microscopía óptica. La *Figura 29* muestra como las NPMs DMSA permanecieron dentro de las células MCF-7 hasta las 72 h después del tratamiento.

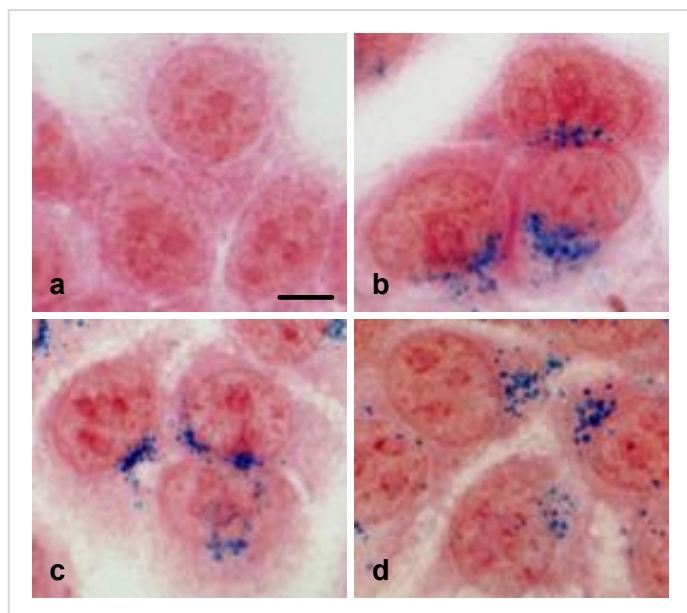
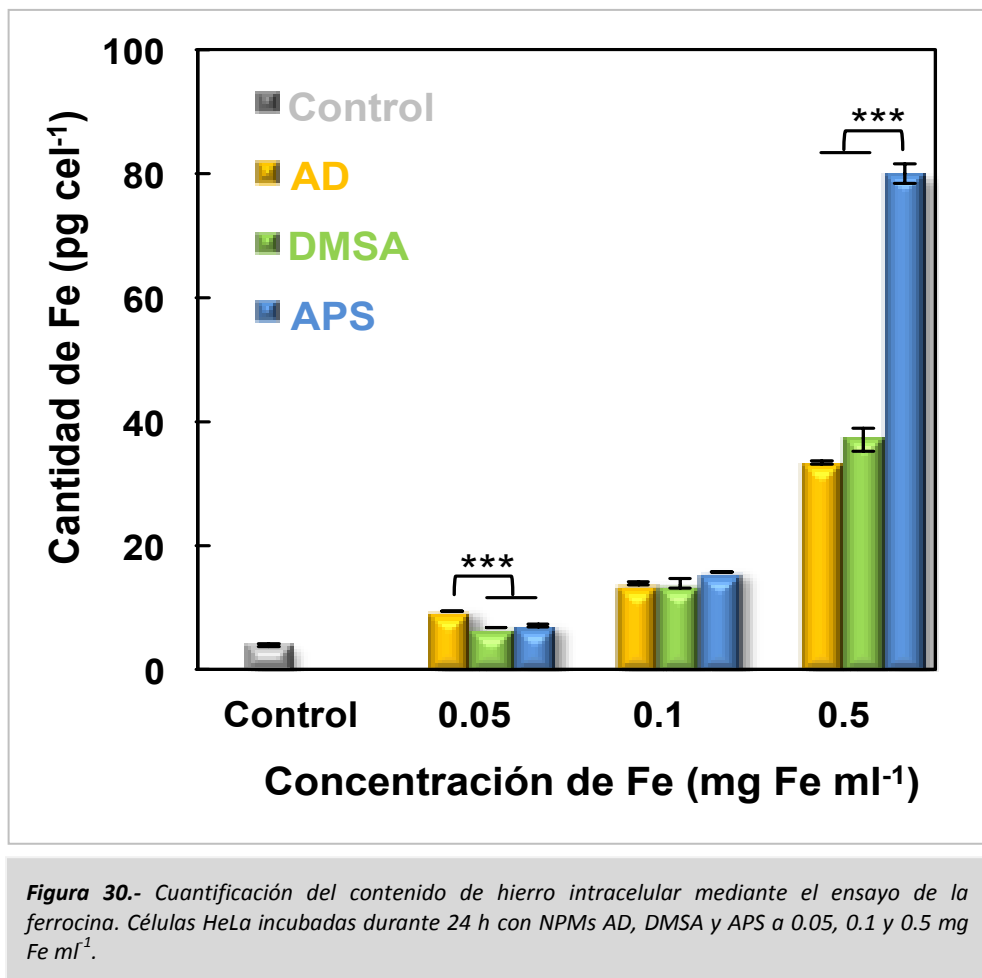


Figura 29.- Persistencia de las NPMs DMSA en el interior de las células MCF-7. (a) Células no tratadas. (b-d) Células incubadas con NPMs DMSA a 0.4 mg Fe ml⁻¹ durante 24 h y teñidas a las 24, 48 y 72 h después de la incubación, respectivamente. Barra de escala: 10 μm.

4. Cuantificación de la acumulación de hierro en el interior celular

Teniendo en cuenta la importancia del grado de acumulación de las NPMs para una posible aplicación biomédica, se llevó a cabo una cuantificación del hierro acumulado en el interior de las células HeLa mediante el ensayo colorimétrico de la ferrocina. Después de procesar las muestras correspondientes a 24 h de incubación con las NPMs revestidas de AD, DMSA y APS (0.05, 0.1 y 0.5 mg Fe ml⁻¹), así como los controles, la cantidad de dichas NPMs en el interior de cada célula a la mayor concentración fue: 33.3 ± 0.2 , 37.1 ± 2.0 y 80.0 ± 1.6 pg Fe cel⁻¹, respectivamente. Como muestra la *Figura 30* las NPMs catiónicas recubiertas de APS se acumulaban en mayor cantidad que

las de AD o las de DMSA. Asimismo, se detectó una cantidad de hierro muy inferior, en las células control, sin incubar con ningún tipo de NPMs.



Con este mismo ensayo también se confirmó que la cantidad de hierro intracelular correspondiente a las NPMs revestidas de DMSA en las células MCF-7 era algo menor que en las células HeLa a las 24 h de incubación con la mayor concentración utilizada (20.6 ± 0.9 pg Fe cel⁻¹ vs 37.1 ± 2.0 pg Fe cel⁻¹). Asimismo, la cantidad de hierro intracelular a las 48 h de incubación (28.0 ± 0.9 pg Fe cel⁻¹) era muy similar a la obtenida a las 24 h de incubación, lo que confirmó que existía una cinética de saturación de acumulación a partir de las 24 h del tratamiento (ver Figura 31).

Asimismo, se corroboraron los resultados cualitativos obtenidos mediante la tinción de azul de Prusia sobre la persistencia de las NPMs recubiertas de DMSA en el interior de las células MCF-7 durante largos períodos de tiempo (48 h de post-incubación) (ver *Figura 32*).

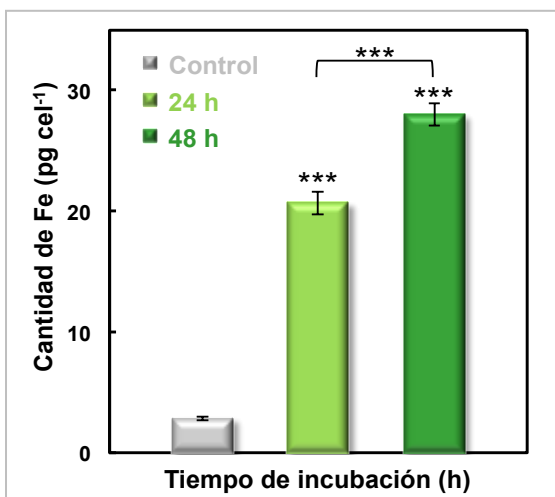


Figura 31.- Cuantificación del contenido de hierro intracelular mediante el ensayo colorimétrico de la ferrocina. Células MCF-7 incubadas durante 24 y 48 h con NPMs DMSA a $0.4 \text{ mg Fe ml}^{-1}$.

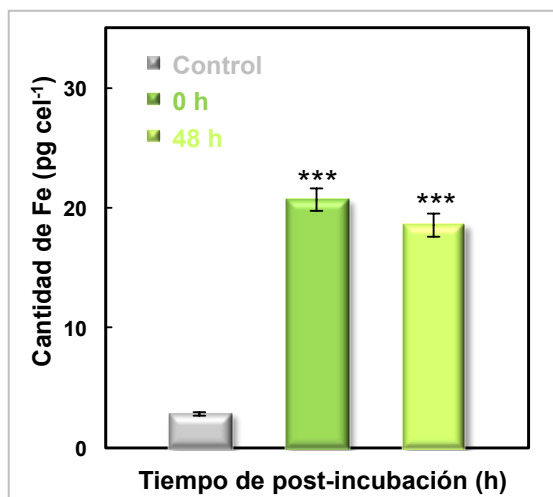


Figura 32.- Cuantificación del contenido de hierro intracelular tras 48 h de post-incubación en células MCF-7 incubadas con NPMs DMSA a $0.4 \text{ mg Fe ml}^{-1}$.

5. Localización de las nanopartículas magnéticas en orgánulos ácidos

Una vez que observamos la elevada eficacia de los diferentes tipos de NPMs para acumularse en el interior de las células, quisimos conocer cuál era su localización subcelular. Para ello, se realizó un ensayo con el LysoTracker® Red DND-99, una sonda fluorescente para compartimentos ácidos, con el fin de identificar a los endosomas tardíos/lisosomas.

Como muestra la *Figura 33*, la distribución intracelular de las NPs AD, DMSA y APS coincide en gran parte con el marcaje del LysoTracker® Red DND-99 indicando una localización predominante en los orgánulos ácidos. Este ensayo se realizó en células “vivas” (sin fijar). Las muestras de NPMs revestidas de heparina mostraron un patrón similar de localización subcelular, pero mucho menos marcado debido a la escasa internalización de estas nanopartículas (imágenes no mostradas). Como

ya se ha comentado, la distribución intracelular para las distintos tipos de NPs consistía en estructuras esféricas de color ocre/marrón, de diferentes tamaños en el citoplasma de la célula.

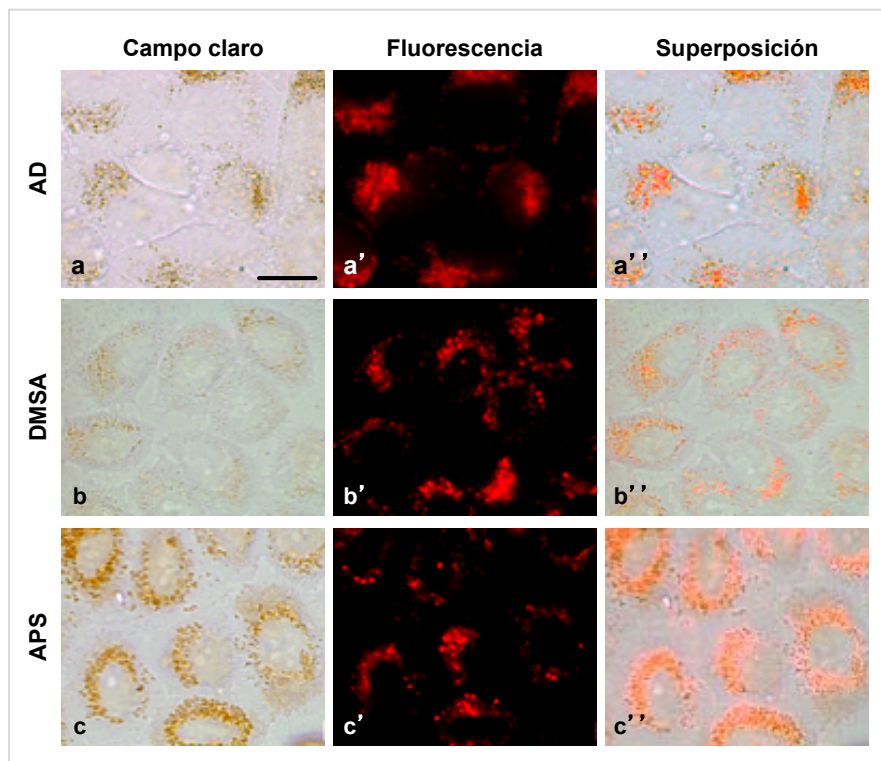


Figura 33.- Localización subcelular de las NPMs y acumulación del LysoTracker® Red DND-99 en compartimentos endocíticos. (a-c) Células incubadas durante 24 h con las NPs AD, DMSA y APS a $0.5 \text{ mg Fe ml}^{-1}$, respectivamente, y observadas en microscopía de campo claro. (a'-c') Localización del LysoTracker® Red en las mismas células bajo microscopía de fluorescencia. (a''-c'') Superposición de ambas imágenes. Barra de escala: $10 \mu\text{m}$.

Asimismo, el patrón de localización de las NPMs recubiertas de DMSA observado en las células MCF-7, MDA-MB-231 y BT-474 fue idéntico al de las células HeLa. Como se muestra en las Figuras 34 y 35 la distribución intracelular de las NPMs DMSA coincidía mayoritariamente con el marcaje de la sonda fluorescente (bien sea por microscopía confocal u óptica de fluorescencia), lo que indicaba que las NPMs se localizaban en los orgánulos ácidos. Las imágenes de las células MCF-

7 y BT-474 en microscopía óptica no son mostradas por presentar el mismo patrón que las células MDA-MB-231, y la de las células MDA-MB-231 en microscopía confocal por mostrar una distribución similar a la de las células MCF-7.

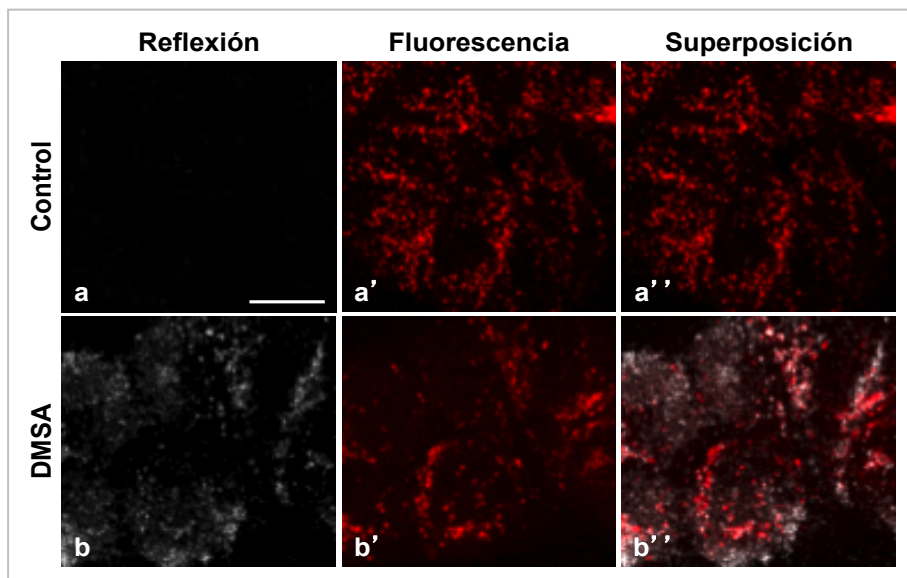


Figura 34.- Localización de las NPMs DMSA y acumulación del LysoTracker® Red DND-99 en compartimentos endocíticos. (a,b) Células MCF-7 control e incubadas con las NPs a $0.4 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ durante 24 h, respectivamente, y observadas en microscopía confocal de reflexión. (a',b') Localización del LysoTracker® Red en las mismas células observadas en microscopía de fluorescencia. (a'') Superposición de las imágenes a y a'. (b'') Superposición de las imágenes b y b'. Barra de escala: $30 \mu\text{m}$.

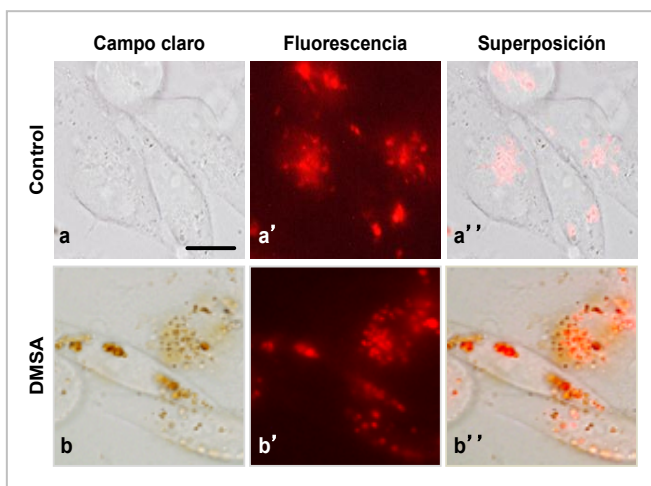


Figura 35.- Localización de las NPMs DMSA y acumulación del LysoTracker® Red en compartimentos endocíticos. (a,b) Células MDA-MB-231 control e incubadas con las NPs a $0.1 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ durante 24 h, respectivamente, y observadas en microscopía de campo claro. (a',b') Localización del LysoTracker® Red en las mismas células observadas en microscopía de fluorescencia. (a'') Superposición de las imágenes a y a'. (b'') Superposición de las imágenes b y b'. Barra de escala: $15 \mu\text{m}$.

6. Mecanismos de internalización de las nanopartículas magnéticas

6.1. Mecanismo endocítico

Para identificar el mecanismo de entrada de las NPMs AD, DMSA y APS en las células, se realizó una incubación de las mismas en frío, concretamente a 4 °C, una temperatura que inhibe la endocitosis por falta de ATP. Para ello, se realizó la incubación con las diferentes NPMs de forma paralela a 37 y 4 °C y posteriormente, se llevó a cabo la tinción con azul de Prusia.

La *Figura 36* evidencia que las NPMs AD, DMSA y APS entraban en las células HeLa por una ruta endocítica. Mientras que a 4 °C las nanopartículas se quedaban fuera de las células, a 37 °C las nanopartículas se acumulaban en el interior de las mismas. Los puntos azules que aparecen en las imágenes corresponden a las NPMs teñidas con azul de Prusia. Las células HeLa control, sin nanopartículas, incubadas a 4 °C presentaban una morfología similar a las células control incubadas a 37 °C.

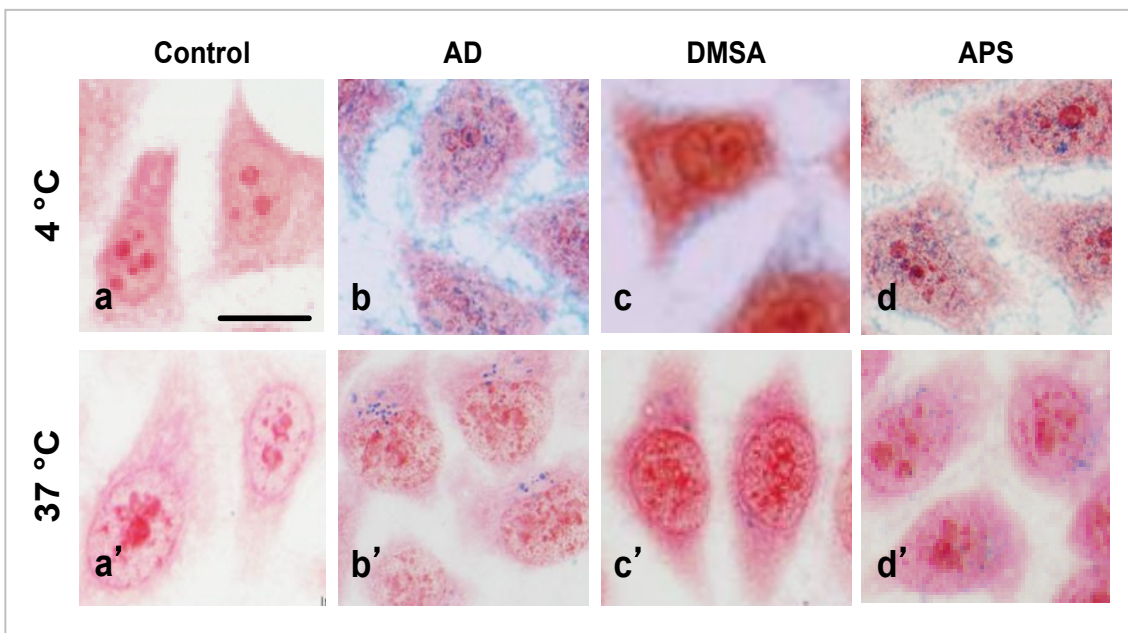


Figura 36.- Influencia de la temperatura en la internalización. (a,a') Células HeLa control incubadas a 4 y 37 °C, respectivamente. (b-d) Células incubadas a 4 °C durante 3 h con NPMs AD, DMSA y APS a 0.5 mg Fe mL⁻¹, respectivamente. (b'-d') Células incubadas durante 3 h a la misma concentración de NPMs, pero a 37 °C. Barra de escala: 10 µm.

Asimismo, como se muestra en las *Figuras 37 A y B*, resultados similares, en cuanto al mecanismo de internalización de las nanopartículas, se obtuvieron con las células MCF-7 y MDA-MB-231 incubadas con NPMs revestidas de DMSA a la concentración final de $0.4 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ durante 3 h a 4 y 37 °C. Las imágenes de las células BT-474 y SK-BR-3, en las mismas condiciones de concentración y tiempo de incubación, no se muestran por presentar resultados muy similares a los anteriores.

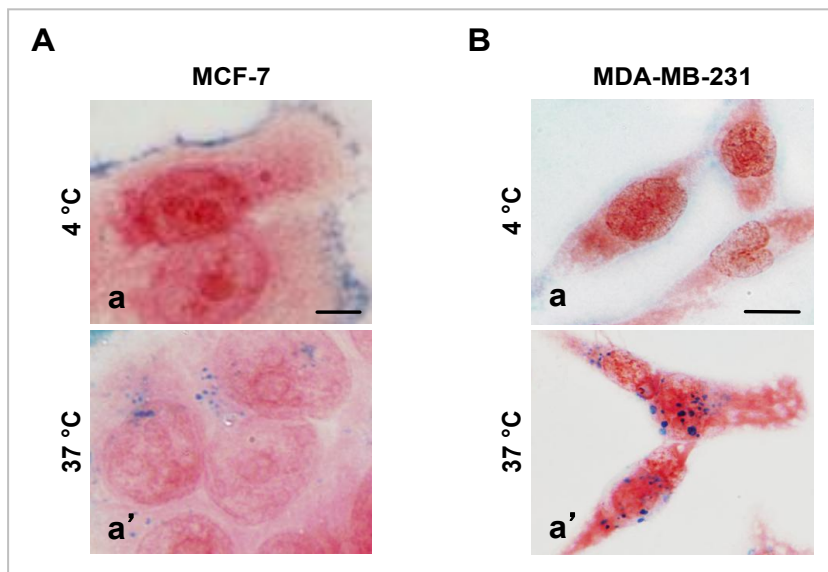


Figura 37.- Influencia de la temperatura en la internalización. (A) Células MCF-7. (a,a') Células incubadas durante 3 h con NPMs DMSA a $0.4 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ a 4 y 37 °C, respectivamente. Barra de escala: 10 μm . (B) Células MDA-MB-231 en las mismas condiciones que (A). Barra de escala: 15 μm .

6.2. Vías endocíticas: endocitosis mediada por clatrina y macropinocitosis

Para identificar el mecanismo concreto de endocitosis (fagocitosis, macropinocitosis, endocitosis mediada por clatrina o endocitosis mediada por caveolina), por el que se internalizaban las NPMs, las células HeLa y MCF-7 fueron incubadas con los diferentes tipos de NPMs (AD, DMSA y APS) a $0.5 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ durante 24 h, y a continuación, se realizaron los estudios en microscopía

electrónica de transmisión. La *Figura 38* muestra como pequeños grupos de nanopartículas se detectaban cerca de la membrana plasmática. En este caso, las NPs aparecen en forma de agregados de color negro. Dependiendo del tamaño de estos agregados, se visualizaron dos vías diferentes de internalización: para los agregados de mayor tamaño (> 200 nm), en la mayoría de los casos, estaban envueltos por extensiones de la membrana plasmática, indicando la existencia de procesos de macropinocitosis como vía de entrada (ver *Figura 38 (a-c)*); y en el caso de agregados de menor tamaño (< 200 nm), las NPs entraban mediante una endocitosis mediada por clatrina, ya que vesículas de clatrina con los pequeños agregados de NPs fueron localizadas en el citoplasma cerca de la membrana plasmática (ver *Figura 38 (d-f)*). Además, en la *Figura 38 (d'-f')* se muestra una célula incubada con cada tipo de NPM AD, DMSA y APS, respectivamente, en la que se observa la acumulación de las nanopartículas en el citoplasma de las células. Sólo se muestran las células HeLa.

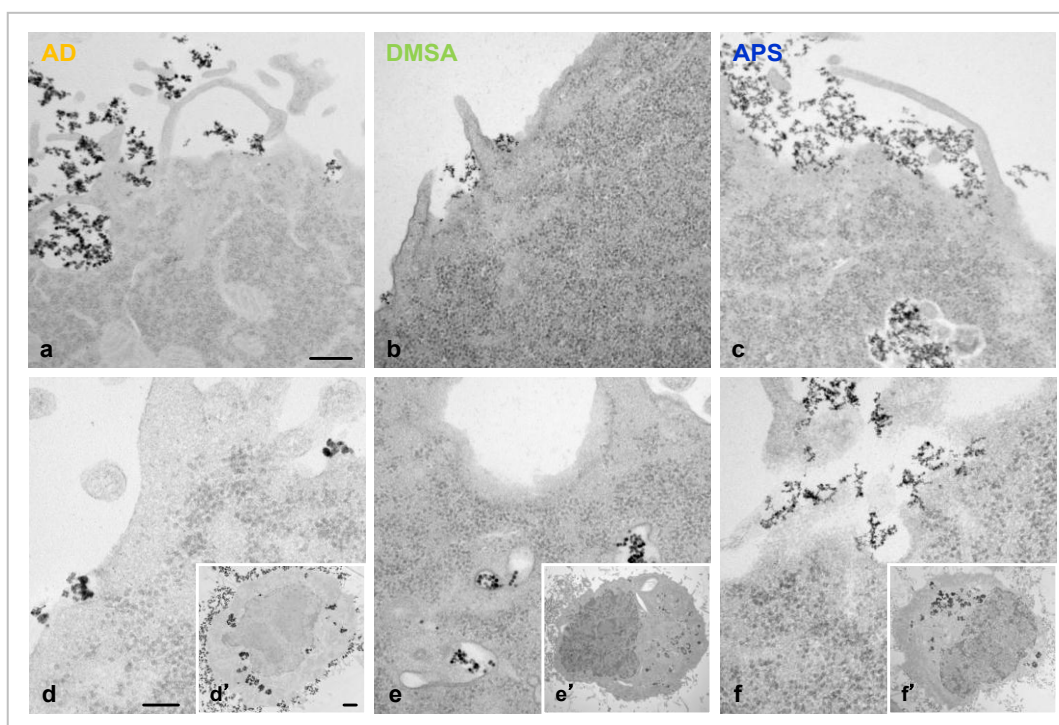


Figura 38.- Imágenes al TEM de secciones de células interaccionando con NPs mediante macropinocitosis o endocitosis mediada por clatrina, respectivamente. (a,d) NPs AD. (b,e) NPs DMSA. (c,f). NPs APS. Barra de escala: 500 y 100 nm, respectivamente. (d',e',f') Imagen de una célula con NPs AD, DMSA, APS en su interior, respectivamente. Barra de escala: 1 μ m.

Posteriormente, estudiamos el procesamiento de los diferentes tipos de nanopartículas en el interior celular, una vez internalizadas por las células. A tiempos cortos de incubación, después de la interacción primaria de las nanopartículas revestidas de DMSA con la membrana plasmática de las células MCF-7, las partículas fueron localizadas cerca de dicha membrana en el interior de unas vesículas parecidas a endosomas tempranos (ver *Figura 39 a*). En etapas de incubación tardías, había mayor cantidad de vesículas que contengan las nanopartículas que se asemejan a cuerpos multivesiculares ya que presentaban vesículas intraluminales en su interior (*Figura 39 b*). Y finalmente, las vesículas adoptaron un aspecto de lisosoma multilamelar que contenía un gran número de agregados de nanopartículas (ver *Figura 39 c,d*). Resultados similares a los presentados se obtuvieron en las células HeLa (imágenes no mostradas).

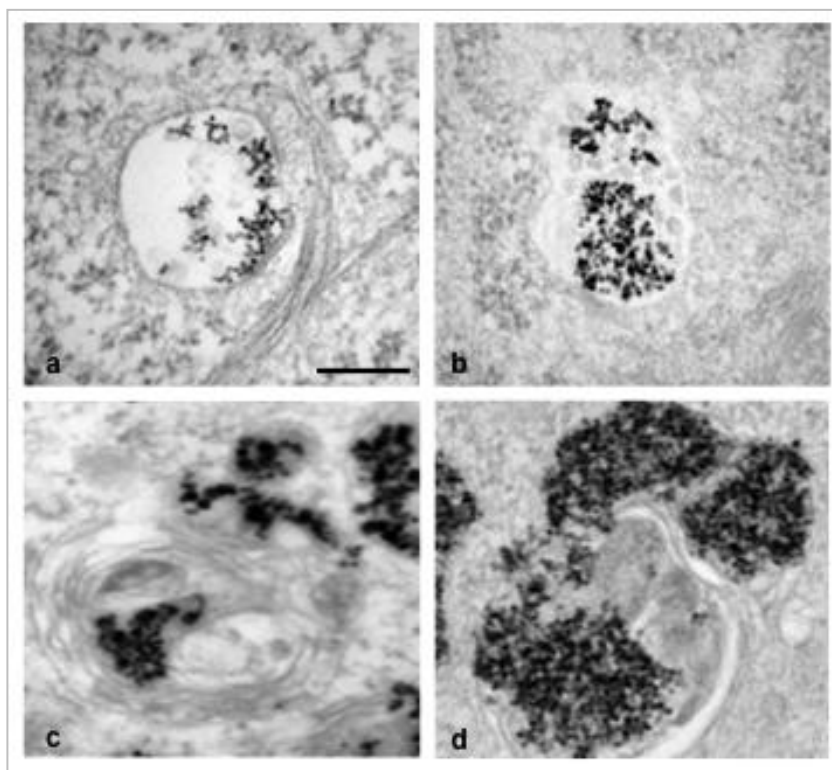


Figura 39.- Imágenes al TEM de diferentes tipos de endosomas conteniendo agregados de NMPs DMSA en células MCF-7. (a) Endosoma temprano. (b) Cuerpo multivesicular. (c,d) Endosomas tardíos y lisosomas con estructura multivesicular y grandes áreas electrodensas. Barra de escala: 200 nm.

7. Acumulación de las NPMs sin alteración de la morfología celular

La morfología celular y nuclear se evaluó mediante las tinciones con rojo neutro y Hoechst-33258, respectivamente. Las células HeLa se incubaron con las diferentes NPMs a $0.5 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ durante 24 h, y posteriormente, se tiñeron con rojo neutro o Hoechst-33258, fluorocromo específico para ADN. Las imágenes obtenidas evidenciaron que las células incubadas con las NPMs AD, DMSA y APS presentaban una morfología similar a la de las células control. Mediante la tinción con rojo neutro se mostró que las células en interfase tenían una forma poligonal con el núcleo ovalado en cuyo interior se visualizaban los nucléolos más teñidos. Con esta tinción se pudo constatar la gran cantidad de NPMs recubiertas de AD, DMSA y APS que se acumulaban en el interior de las células (ver *Figura 40 (b-d)*). Mediante la tinción del ADN se mostró que los núcleos interfásicos de las células incubadas con las mismas nanopartículas, presentaban una forma ovalada y tenían una cromatina laxa, siendo completamente similares a los núcleos de las células control (ver *Figura 40 (b'-d')*). Asimismo, las figuras mitóticas visualizadas tampoco diferían de las células no tratadas, por lo que no se muestran las imágenes obtenidas para estas NPs. Sin embargo, las células preincubadas con NPMs revestidas de heparina presentaban metafases alteradas con cromosomas desplazados de la placa ecuatorial, aunque la morfología de las células en interfase sí que era similar a las células control (ver *Figura 40 (e,e')*).

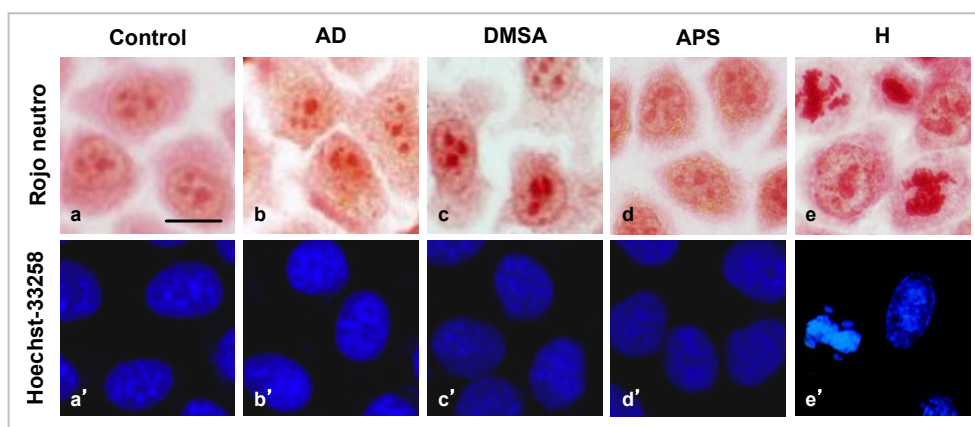


Figura 40.- Análisis de la morfología celular mediante tinción con rojo neutro y Hoechst-33258. (a,a') Células HeLa control. (b,b') Células incubadas con NPMs AD a $0.5 \text{ mg Fe ml}^{-1}$; (c,c') con NPMs DMSA; (d,d') con NPMs APS; y (e,e') con NPMs H. Scale bar = $10 \mu\text{m}$.

Resultados similares a los anteriormente descritos, se obtuvieron en las células MCF-7, MDA-MB-231 y BT-474 incubadas con las NPMs DMSA a $0.4 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ durante 24 h (ver Figuras 41 A y B). La morfología general fue similar a la de las células control y los núcleos también presentaron características similares a los de las células control. Es interesante destacar que después de la tinción con rojo neutro, todavía se podían detectar las partículas de color ocre en el citoplasma de las células. Las imágenes de las células BT-474 no han sido incluidas por su similitud con las mostradas.

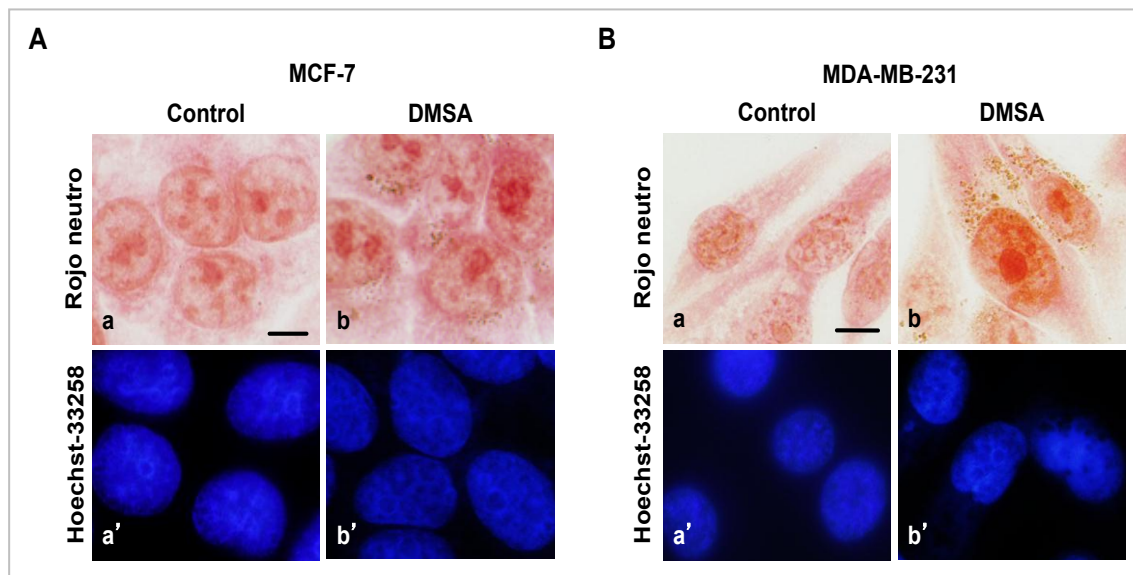


Figura 41.- Análisis de la morfología celular mediante tinción con rojo neutro y Hoechst-33258. (A) Células MCF-7. (a,a') Células control. (b,b') Células incubadas con NPMs DMSA a $0.4 \text{ mg Fe ml}^{-1}$. Barra de escala = $10 \mu\text{m}$. (B) Células MDA-MB-231 con las mismas condiciones que (A). Barra de escala: $15 \mu\text{m}$.

Asimismo, mediante microscopía electrónica de barrido pudimos confirmar que las NPMs del presente estudio aparecían adheridas a la superficie de las células sin inducir alteraciones en la morfología celular ni en la integridad de la membrana plasmática, ya que esta técnica permite evaluar la superficie celular. La Figura 42 muestra células HeLa control e incubadas durante 3 h con los diferentes tipos de NPMs (AD, DMSA y APS) a $0.1 \text{ mg Fe ml}^{-1}$, respectivamente. En la Figura 42 a se observa una célula control en interfase con su característica forma aplanada, una superficie más o menos lisa y las adhesiones al sustrato. En la Figura 42 (b-d) se aprecia una célula con la superficie

externa de la membrana plasmática cubierta de nanopartículas AD, DMSA o APS, respectivamente, sin alteraciones en la misma.

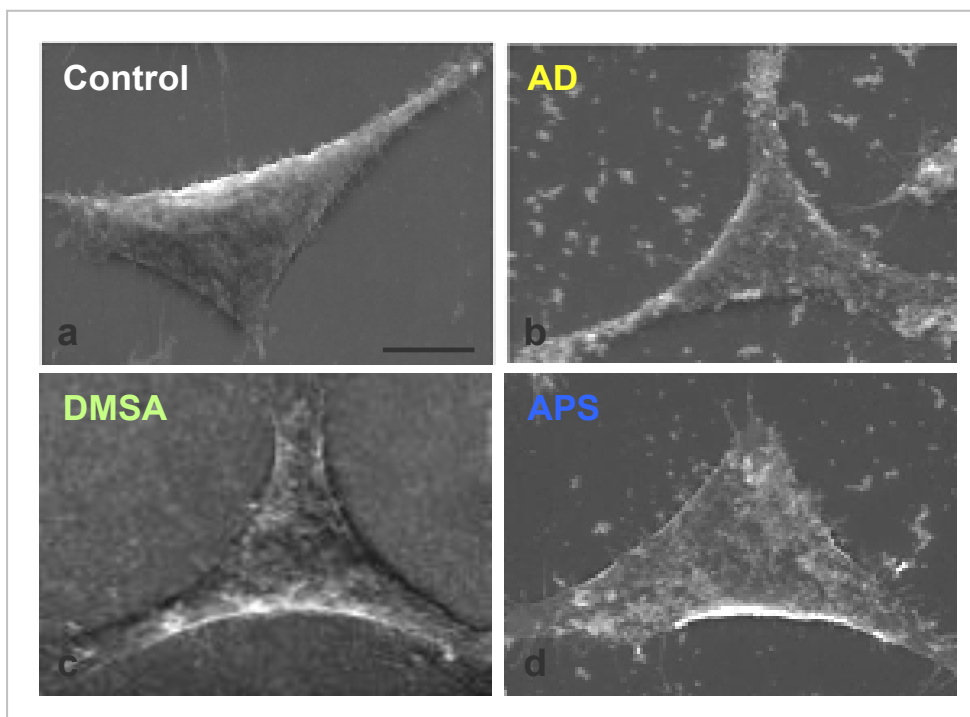


Figura 42.- Imágenes al SEM de células HeLa. (a) Célula control. (b-d) Células incubadas durante 3 h con NPMs AD, DMSA y APS a $0.1 \text{ mg Fe ml}^{-1}$, respectivamente. Barra de escala: $10 \mu\text{m}$.

8. Análisis del citoesqueleto y de la proteína vinculina

8.1. Distribución y organización de los microtúbulos sin alteraciones, a excepción de las NPMs de heparina

El efecto de la internalización de las distintas nanopartículas magnéticas en los MTs interfásicos y del huso mitótico se analizó mediante inmunofluorescencia indirecta para α -tubulina (ADN contrateñido con Hoechst-33258). La incubación de las diferentes NPMs en las células HeLa se realizó durante 24 h a la concentración más elevada ($0.5 \text{ mg Fe ml}^{-1}$).

Como muestra la *Figura 43 (b-e, b'- e')*, los MTs interfásicos presentaban una distribución y una morfología similar a la de las células control, por lo que no se vieron alterados por la preincubación a pesar de la gran cantidad de NPs acumuladas en el interior de las células. Asimismo, la incubación de las células con NPMs revestidas de AD, DMSA y APS tampoco alteraba la morfología de los husos mitóticos. Los recuentos de los correspondientes índices mitóticos, no presentó diferencias significativas respecto a los valores control ($4.9 \pm 0.1\%$). Sin embargo, los MTs del huso mitótico aparecieron afectados por la incubación con NPMs recubiertas de heparina, que inducían un incremento del número de metafases (IM: $8.5 \pm 0.2\%$), 24 h después de la incubación a la concentración de $0.5 \text{ mg Fe ml}^{-1}$, presentando el $93.1 \pm 0.1\%$ de las metafases una morfología alterada (cromosomas descolocados de la placa ecuatorial), así como, la presencia de más de dos polos en los husos (metafases multipolares) (ver *Figura 43 (i,i')*).

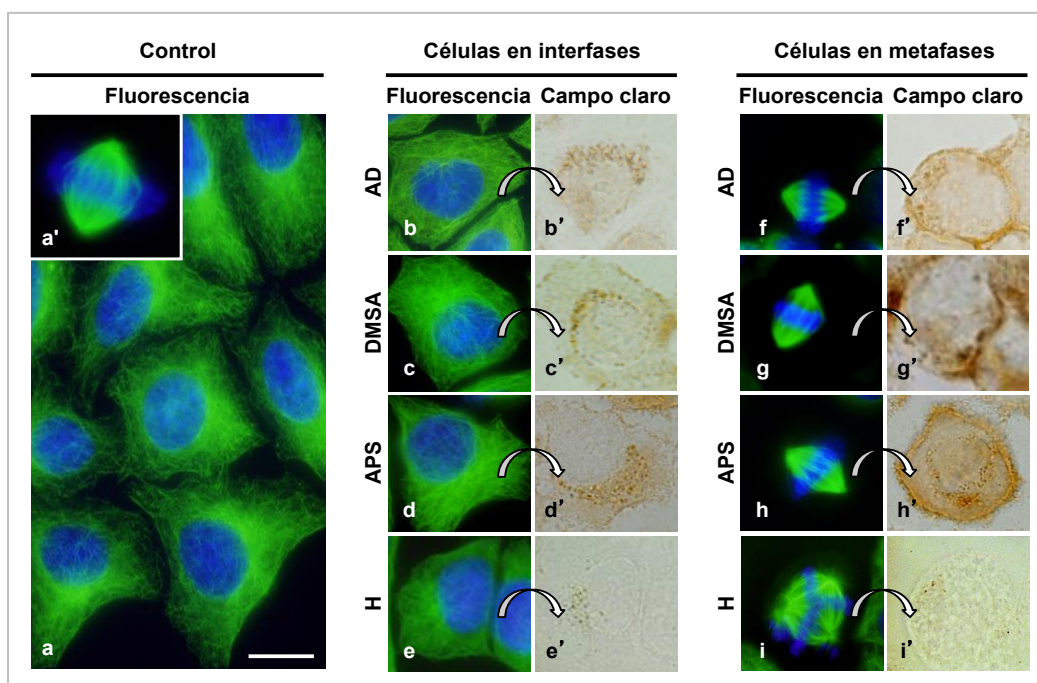


Figura 43.- Análisis de los microtúbulos en células HeLa. Imágenes superpuestas de la inmunofluorescencia indirecta para α -tubulina (verde) y contratinción con Hoechst-33258 (azul). Panel de la izquierda: (a) Interfases de células control. (a') Metáfase de una célula control. Panel del medio: (b,b') Interfase de células incubadas durante 24 h con NPMs AD a $0.5 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ y observadas en microscopía de fluorescencia y campo claro, respectivamente; (c,c') DMSA; (d,d') APS; y (e,e') H. Panel derecho: (f,f') Metáfase de células incubadas con NPMs AD; (g,g') DMSA; (h,h') APS o (i,i') H. Barra de escala: $10 \mu\text{m}$.

El efecto de la internalización de las NPMs recubiertas de DMSA a $0.4 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ en la organización de los microtúbulos fue evaluado a las 24, 48 y 72 h de incubación en células tumorales de mama MCF-7, MDA-MB-231 y BT-474. Tanto los MTs interfásicos como los husos mitóticos presentaban una distribución y organización similar a los de las células control (ver *Figura 44 A y B*). Las imágenes a 24 y 48 h de incubación no son mostradas ya que son idénticas a las de mayor tiempo de incubación (72 h). Tampoco se muestran las imágenes de las células BT-474 por presentar morfologías similares a las dos líneas comentadas anteriormente. Los recuentos de los correspondientes índices mitóticos, no presentó diferencias significativas respecto a los valores del control ($2.6 \pm 0.3\%$ para MCF-7 y $3.1 \pm 0.1\%$ para MDA-MB-231).

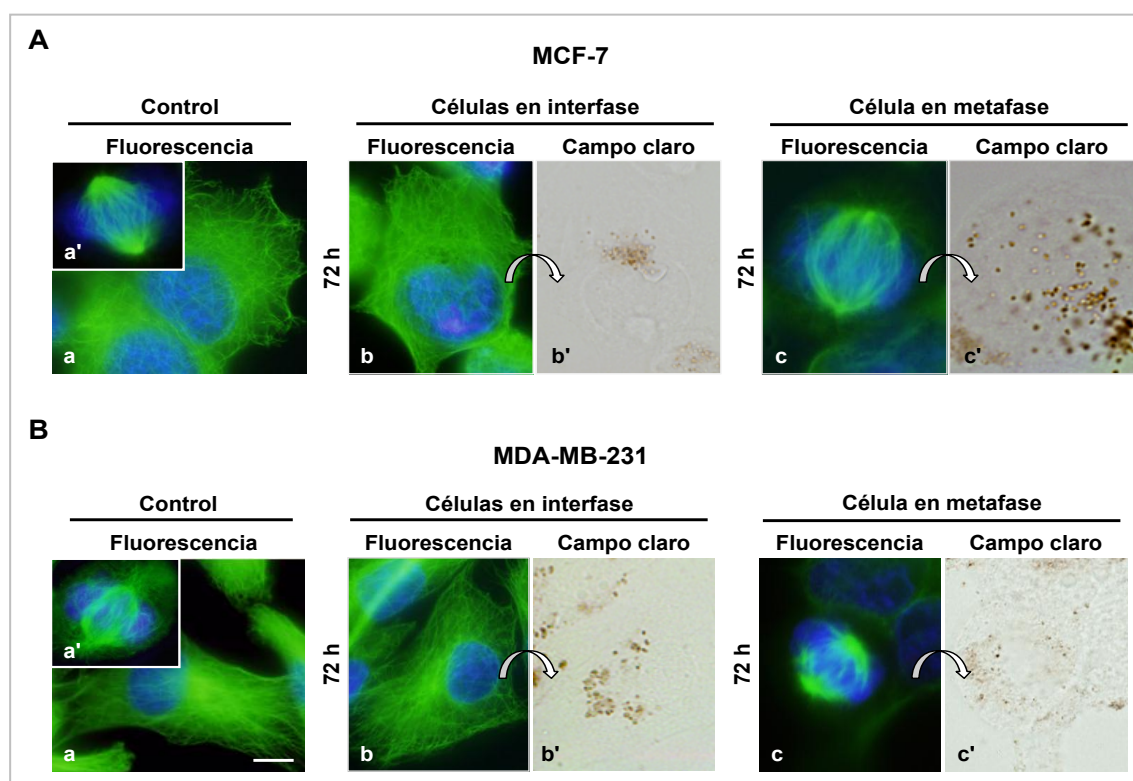


Figura 44.- Análisis de los microtúbulos. Imágenes superpuestas de la inmunofluorescencia indirecta para α -tubulina y contratinción con Hoechst-33258. (A) Células MCF-7. (a) Interfases de células control. (a') Metafase de una célula control. (b,b') Interfase de células incubadas durante 72 h con NPMs DMSA a $0.4 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ y observadas en microscopía de fluorescencia y campo claro, respectivamente. (c,c') Metafase de células incubadas durante 72 h. Barra de escala: $10 \mu\text{m}$. (B) Células MDA-MB-231 en las mismas condiciones que (A). Barra de escala: $15 \mu\text{m}$.

8.2. Organización de los filamentos de actina y de la proteína vinculina sin alteraciones

El efecto de la internalización de las distintas NPMs en la distribución de la proteína vinculina y de los filamentos de actina, se analizó mediante inmunofluorescencia indirecta para vinculina y marcaje de los filamentos de actina (fibras de estrés) con faloidina conjugada a Alexa Fluor® 555, todo ello seguido de una contratinción del ADN con Hoechst-33258. De modo que, la actina-F emitía en rojo, la vinculina en verde, y el ADN en azul.

La *Figura 45 a* muestra una imagen representativa de la distribución de la proteína vinculina, la actina-F y el ADN en una célula HeLa control. Como se puede apreciar, las células HeLa mostraban fibras de estrés recorriendo el citoplasma y finalizando en los contactos focales. Precisamente, en esta diferenciación de la membrana plasmática se localizaba la proteína vinculina, implicada en la adhesión celular. Al ser la fotografía el resultado de la superposición de las correspondientes imágenes, la vinculina aparece en color amarillo. Como se aprecia en la *Figura 45*, las células incubadas con las NPMs AD, DMSA y APS a la mayor concentración ($0.5 \text{ mg Fe ml}^{-1}$) durante 24 h, no presentaban alteraciones en la organización ni en la distribución tanto de la vinculina como de la actina-F, y por lo tanto, no sufrían pérdida de adhesión al sustrato.

Asimismo, resultados similares a los obtenidos en las células HeLa se obtuvieron en las células tumorales de mama MCF-7, MDA-MB-231 y BT-474 cuando fueron incubadas con NPMs revestidas de DMSA a $0.4 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ y evaluadas a distintos tiempos de incubación: 24, 48 y 72 h. La actina-F se disponían en las células de forma similar a los de las células control y la proteína vinculina se localizaba en los contactos focales sin que las células sufrieran una pérdida de adhesión al cubreobjeto donde se sembraban (ver *Figura 46 A y B*). Las imágenes correspondientes a las 24 y 48 h de incubación no son mostradas por ser similares a las de 72 h, y tampoco las de las células BT-474 por presentar una distribución y organización de la actina-F y proteína vinculina similar a la de las dos líneas celulares de mama comentadas.

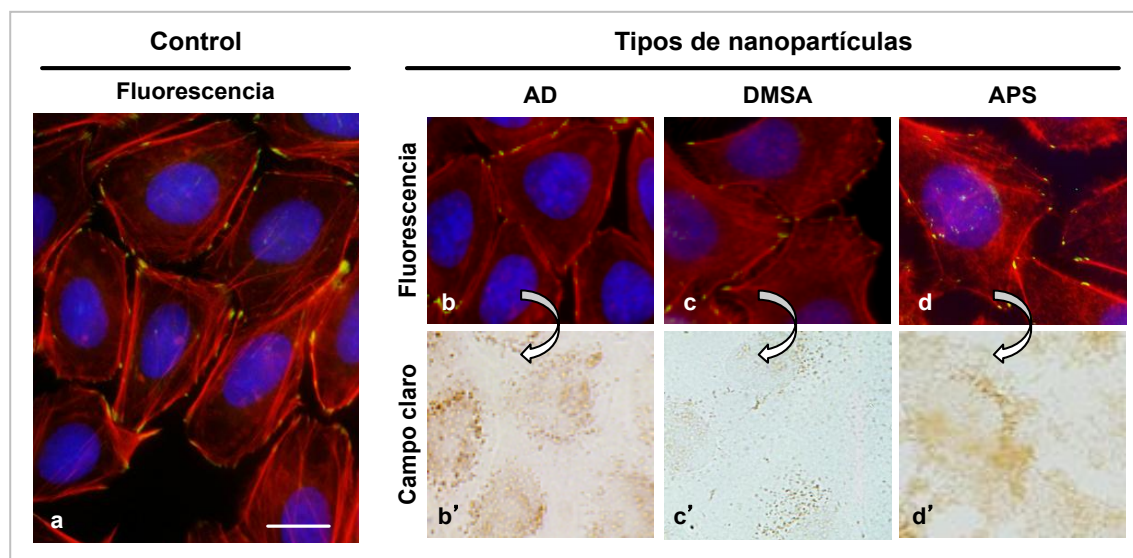


Figura 45.- Análisis de los filamentos de actina y la proteína vinculina en células HeLa. Imágenes superpuestas de la inmunofluorescencia indirecta para vinculina (verde), marcaje de actina-F con faloidina marcada con Alexa Fluor® 555 (rojo) y contratinción con Hoechst-33258 (azul). (a) Células control. (b,b') Células incubadas durante 24 h con NPMs AD a $0.5 \text{ mg Fe mL}^{-1}$ y observadas en microscopía de fluorescencia y campo claro, respectivamente; (c,c') con NPMs DMSA; y (d,d') con NPMs APS. Barra de escala: $10 \mu\text{m}$.

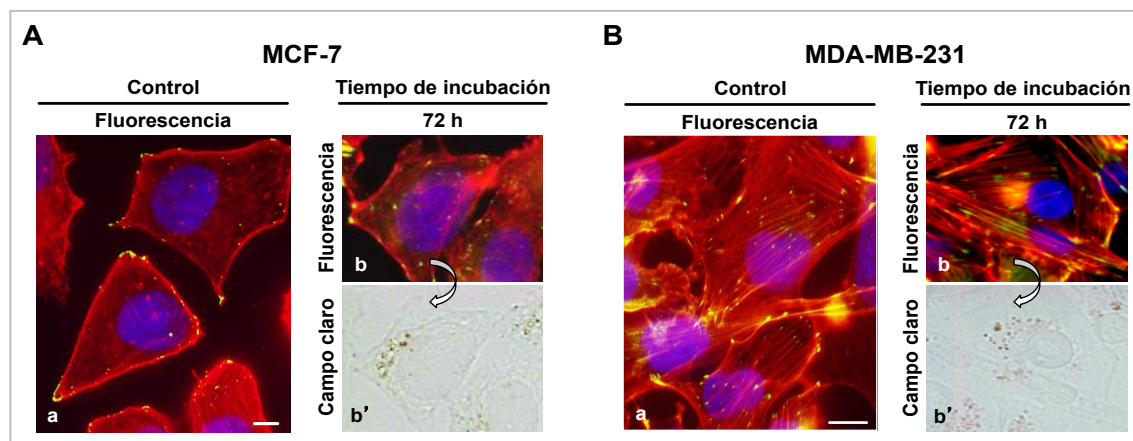


Figura 46.- Análisis de los filamentos de actina y la proteína vinculina. Imágenes superpuestas de la inmunofluorescencia indirecta para vinculina, marcaje de actina-F con faloidina marcada con Alexa Fluor® 555 y contratinción con Hoechst-33258. (A) Células MCF-7. (a) Células control. (b,b') Células incubadas durante 72 h con NPMs DMSA a $0.4 \text{ mg Fe mL}^{-1}$ y observadas en microscopía de fluorescencia y campo claro, respectivamente. Barra de escala: $10 \mu\text{m}$. (B) Células MDA-MB-231 en las mismas condiciones que (A). Barra de escala: $15 \mu\text{m}$.

9. Ciclo celular sin alteraciones

La posible alteración en la distribución de las diferentes fases del ciclo celular, por internalización y acumulación de las diferentes nanopartículas magnéticas, se evaluó mediante la tinción con ioduro de propidio por citometría de flujo. Las células HeLa se incubaron con las NPMs AD, DMSA y APS a $0.5 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ durante 24 h. Como se muestra en la *Figura 47*, ninguno de los tres tipos de NPMs inducía cambios en la distribución de las diferentes fases del ciclo celular y los histogramas obtenidos fueron similares al de las células control.

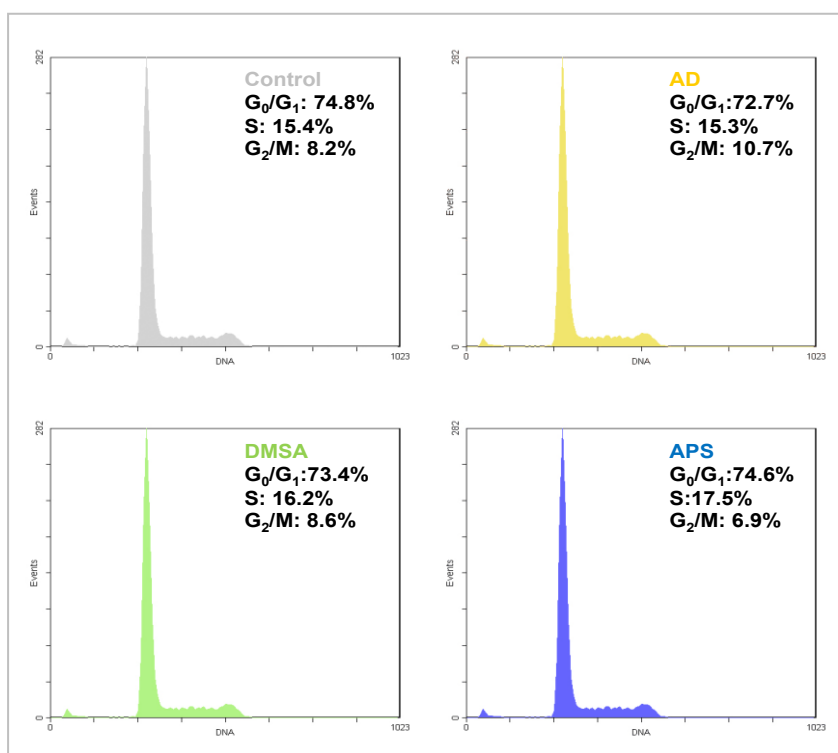


Figura 47.- Análisis del ciclo celular de células HeLa incubadas con NPMs AD, DMSA y APS a $0.5 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ durante 24 h.

Resultados similares se obtuvieron en las líneas celulares tumorales de mama MCF-7, MDA-MB-231, BT-474 y SK-BR-3 después de 24 h de incubación con las NPMs DMSA a una concentración de 0.4 o de $0.1 \text{ mg Fe ml}^{-1}$, en el caso de las células MDA-MB-231 (ver *Figura 48 A-D*). El histograma

correspondiente a las células MDA-MB-231 a la concentración de $0.4 \text{ mg Fe ml}^{-1}$, no se ha mostrado por no presentar diferencias respecto al de $0.1 \text{ mg Fe ml}^{-1}$.

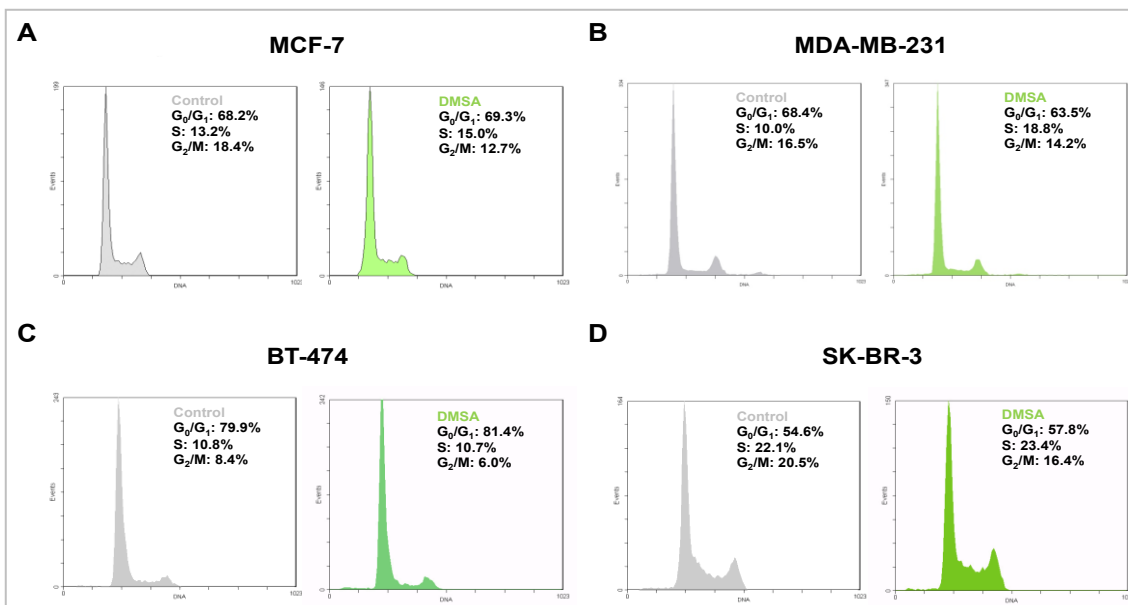


Figura 48.- Análisis del ciclo celular a las 24 h de incubación con NPMs DMSA. (A) Células MCF-7 incubadas con las NPs a $0.4 \text{ mg Fe ml}^{-1}$. (B) Células MDA-MB-231 tratadas con las NPs a $0.1 \text{ mg Fe ml}^{-1}$. (C) Células BT-474 y (D) Células SK-BR-3 misma concentración que (B).

10. No generación de estrés oxidativo

Con el fin de descartar que las NPMs pudieran generar estrés oxidativo en las células, se evaluaron los niveles intracelulares de ROS mediante el ensayo de la DA-DCFH. Las células HeLa se incubaron con las NPMs AD, DMSA y APS a $0.5 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ durante 24 h. Ninguno de los tres tipos de nanopartículas ensayadas produjeron una cantidad significativa de ROS. Como se muestra en la *Figura 49*, inmediatamente después de la incubación con las NPs, la intensidad de la fluorescencia verde emitida fue similar a la de las células control (no tratadas). Como control positivo para este ensayo, las células HeLa fueron expuestas a $400 \text{ } \mu\text{M}$ de H_2O_2 durante 1 h.

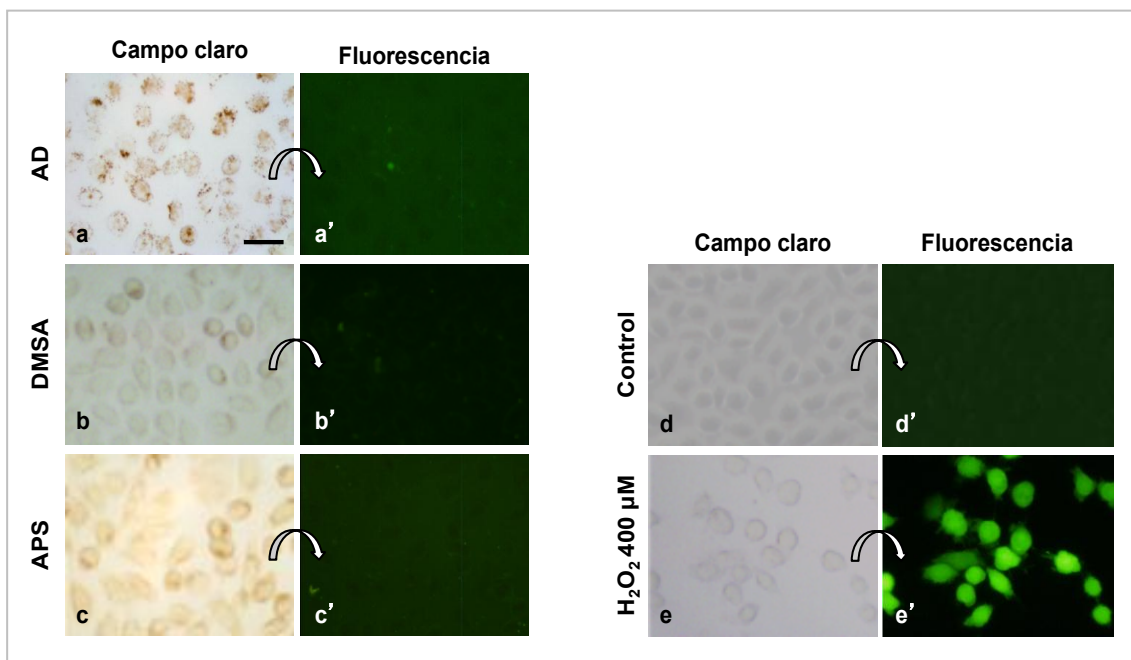


Figura 49.- Caracterización cualitativa de la generación de ROS mediante el ensayo DCFH-DA. Panel izquierdo: células incubadas con NPMs y marcadas con DA-DCFH visualizadas en microscopía de campo claro y fluorescencia, respectivamente. (a,a') Células preincubadas con NPMs AD a $0.5 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ durante 24 h; (b,b') DMSA. (c,c') APS. Panel derecho: (d,d') Imagen de células HeLa no incubadas con NPMs y marcadas con la sonda DA-DCFH. (e,e') Células tratadas durante 1 h con H_2O_2 a $400 \mu\text{M}$. Barra de escala: $20 \mu\text{m}$.

Asimismo, tampoco se detectó una cantidad de ROS significativa después de la incubación con NPMs revestidas de DMSA a la concentración de $0.4 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ durante 72 h en las células MCF-7, MDA-MB-231 y BT-474. Como control positivo de estos ensayos, las células fueron expuestas a $800 \mu\text{M}$ de H_2O_2 durante 1 h 30 min (ver Figura 50 A y B). Las imágenes de las células BT-474 ni de las células MDA-MB-231 a la concentración de $0.4 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ a las 72 h de incubación, no se han incorporado, ya que los resultados fueron similares a los presentados.

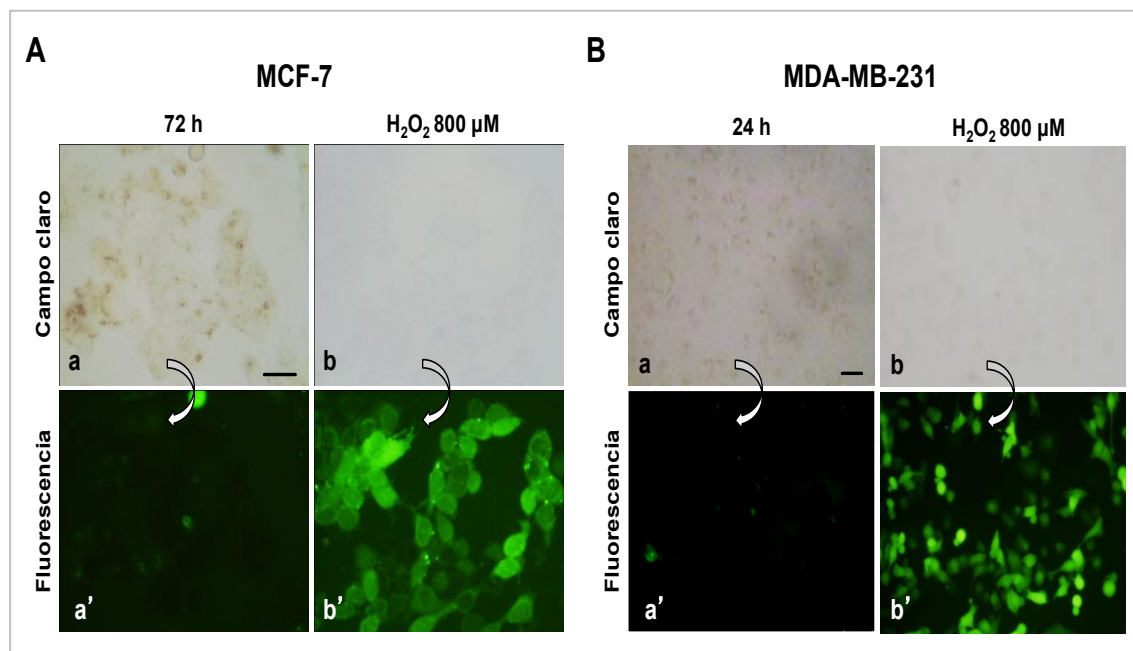


Figura 50.- Niveles intracelulares de ROS en células marcadas con DA-DCFH. (A) Células MCF-7. (a,a') Incubadas con NPMs DMSA a 0.4 mg Fe ml⁻¹ durante 72 h y observadas en microscopía de campo claro y fluorescencia, respectivamente. (b,b') Tratadas con H₂O₂ a 800 μM durante 1 h 30 min. (B) Células MDA-MB-231. Mismas condiciones que en (A) pero a 0.1 mg Fe ml⁻¹ durante 24 h. Barra de escala: 50 μm.

11. Sin alteraciones en la viabilidad celular, a excepción de las NPs de heparina

Los resultados de supervivencia celular fueron obtenidos mediante el ensayo colorimétrico del MTT, realizado a las 24 h de la incubación con las NPMs. Como muestra la *Figura 51*, el análisis de la citotoxicidad después de la incubación de las células HeLa con las distintas NPMs a las concentraciones ensayadas (0.05, 0.1 y 0.5 mg Fe ml⁻¹), no indicó cambios en la viabilidad celular después de 24 h de tratamiento (sólo se muestra los datos de la mayor concentración) con ninguna de las NPMs ensayadas, excepto para las recubiertas de heparina que a la mayor concentración inducían una disminución de la viabilidad de aproximadamente un 25%.

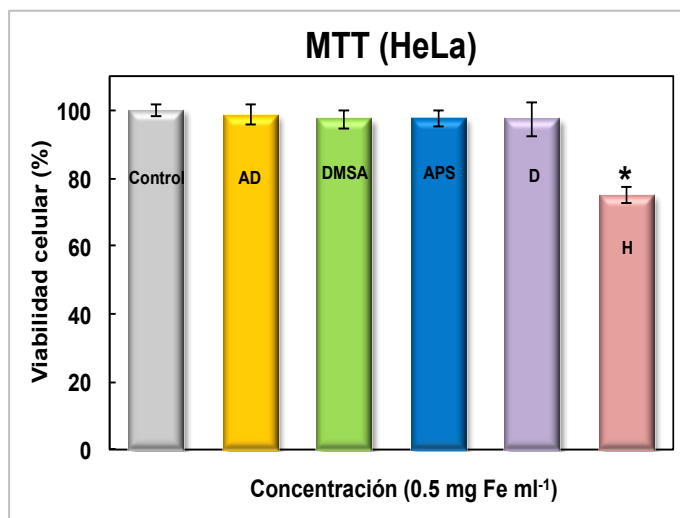


Figura 51.- Ensayo de viabilidad del MTT 24 h después del tratamiento con NPMs AD, DMSA, APS, D y H a 0.5 mg Fe ml⁻¹ en células HeLa.

Asimismo, la supervivencia de las células MCF-7, MDA-MB-231 y BT-474 tampoco se veía afectada cuando se incubaron los distintos tipos celulares con NPMs revestidas de DMSA a las concentraciones de 0.05, 0.1 y 0.4 mg Fe ml⁻¹ (sólo se muestran los datos de la concentración más elevada en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231) (ver *Figura 52 A y B*).

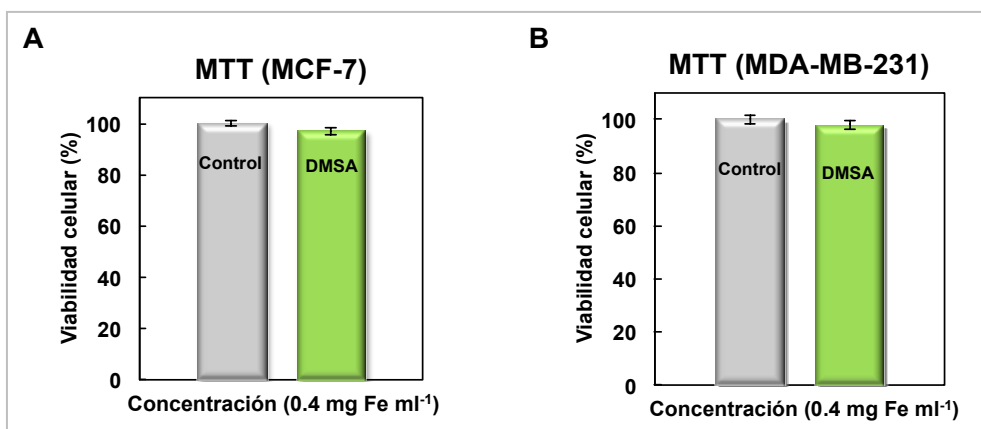


Figura 52.- Ensayo de viabilidad del MTT 24 h después del tratamiento con NPMs DMSA a 0.4 mg Fe ml⁻¹. (A) Células MCF-7. (B) Células MDA-MB-231.

Además, para corroborar los resultados obtenidos con el MTT, se realizó otro ensayo de viabilidad, el test de exclusión del azul Tripán. Como se muestra en los siguientes gráficos, los porcentajes de supervivencia después de los tratamientos con las diferentes NPMs fueron similares a los de las células control, tanto en células HeLa (Figura 53) como en células MCF-7 (Figura 54 A) y MDA-MB-231 (Figura 54 B).

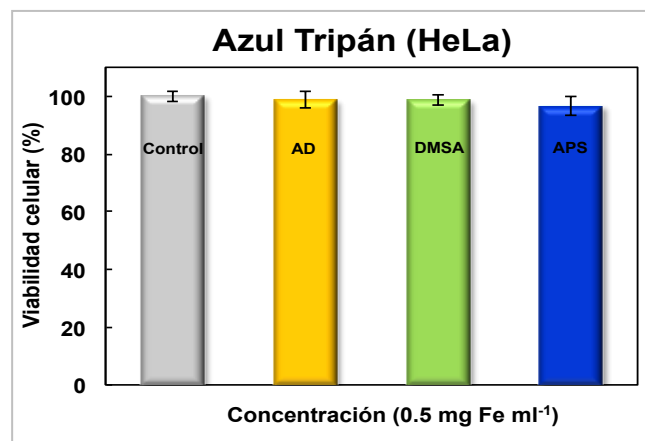


Figura 53.- Ensayo vital del azul Tripán inmediatamente después del tratamiento con NPMs AD, DMSA y APS a 0.5 mg Fe ml⁻¹ en células HeLa.

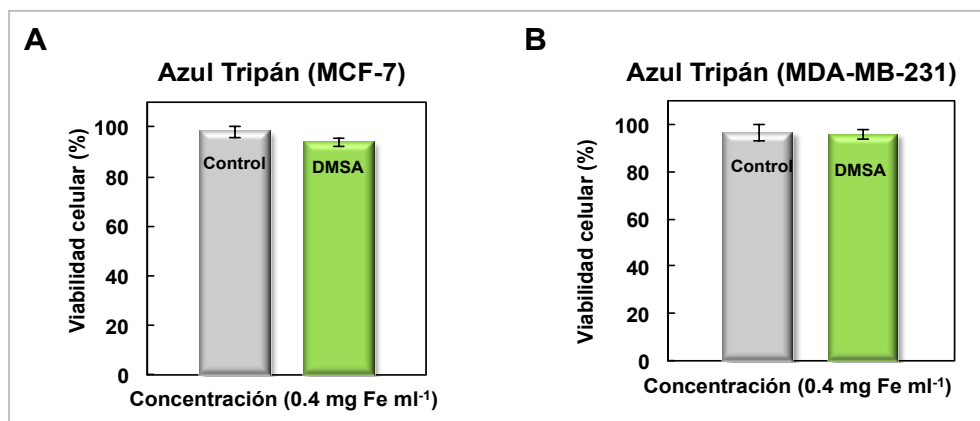


Figura 54.- Test de exclusión del azul Tripán inmediatamente después de tratamiento con NPMs DMSA a 0.4 mg Fe ml⁻¹. (A) Células MCF-7. (B) Células MDA-MB-231.

12. Estudios en las células MCF-10A

Asimismo, se realizaron estudios con una línea celular no tumoral humana, MCF-10A, procedente de una lesión fibroquística de mama. Mediante la tinción con azul de Prusia, pudimos observar que las NPMs revestidas de DMSA a la concentración de $0.4 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ después de 24 h de incubación se acumulaban en las células, y mediante el TEM, se mostró que la internalización se producía por un mecanismo endocítico, macropinocitosis o endocitosis mediada por clatrina (ver *Figura 55 A y B*). Estas NPMs no inducían citotoxicidad ni estrés oxidativo en las células MCF-10A, corroborado mediante las tinciones de rojo netro y Hoechst-33258 y con el ensayo cualitativo de la producción de ROS (ver *Figura 55 C y D*). La viabilidad de estas células fue evaluada mediante el ensayo colorimétrico del MTT 24 h después del tratamiento. Como muestra la *Figura 55 E*, la supervivencia celular tampoco se veía disminuida cuando se incubaron con las NPMs recubiertas de DMSA a la concentración de $0.4 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ durante 24 h. Todos estos datos obtenidos nos indican que las nanopartículas eran capaces de internalizarse y acumularse tanto en células tumorales de mama (MCF-7, MDA-MB-231, BT-474 y SK-BR-3) como en las células no tumorales mama (MCF-10A).

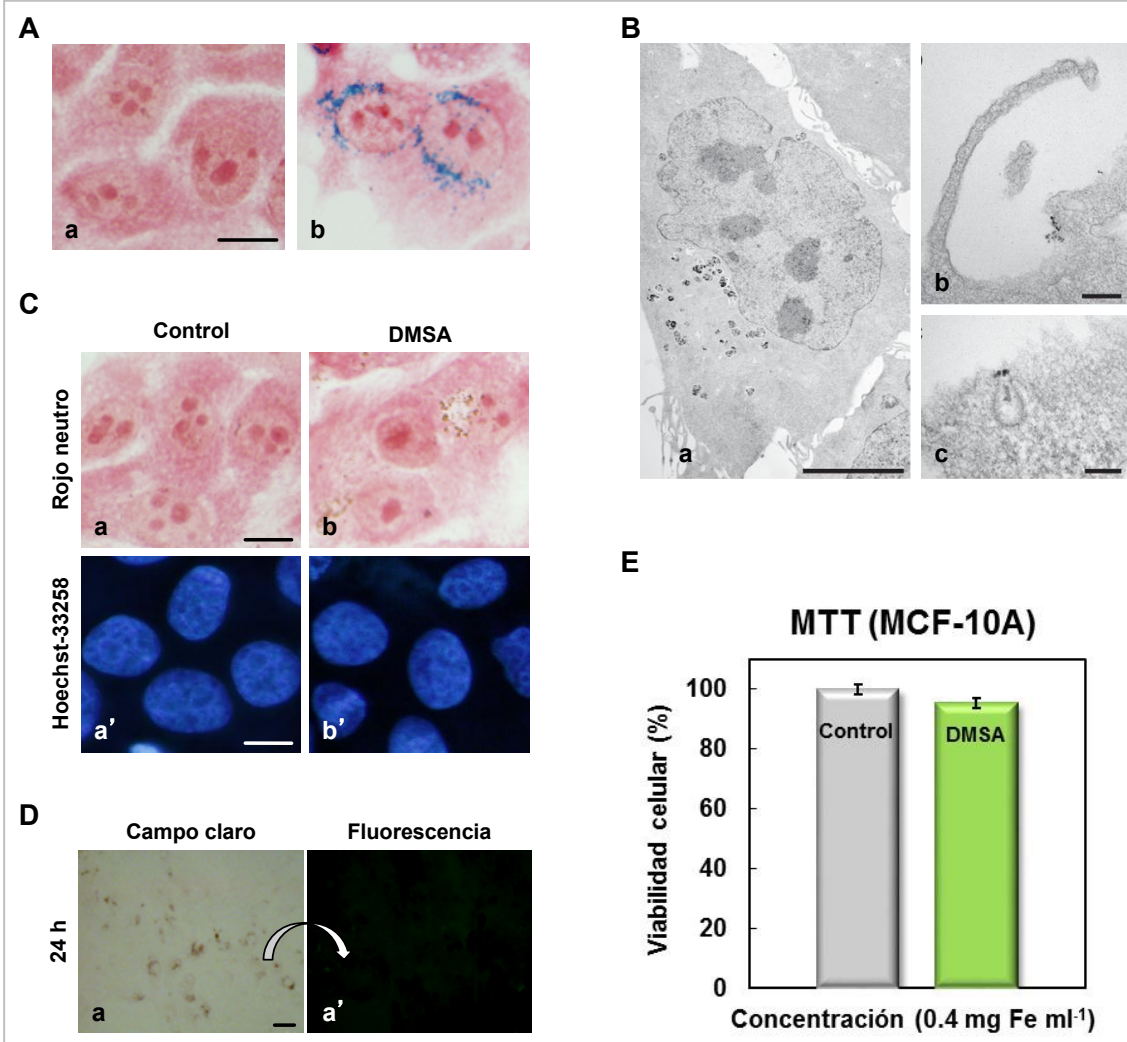
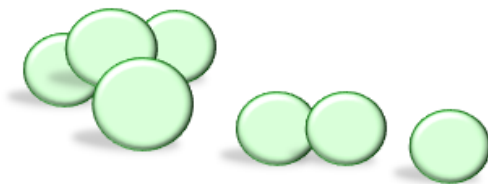
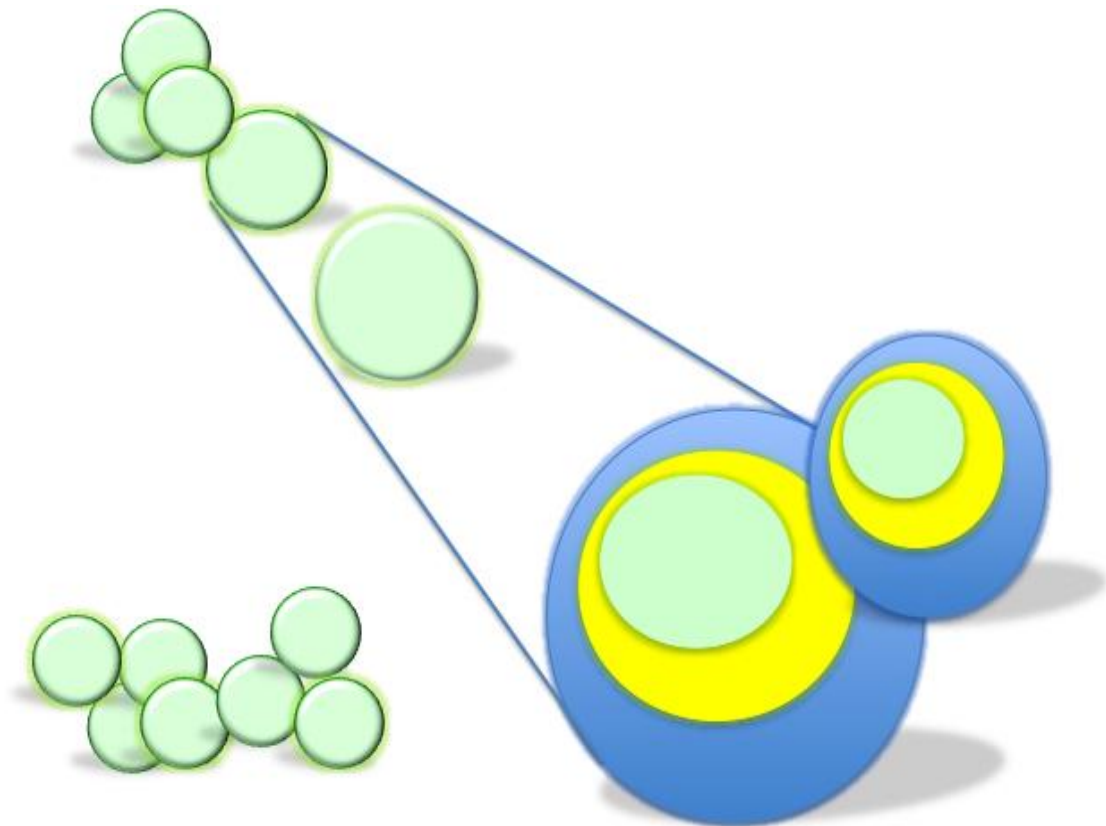


Figura 55.- (A) Células MCF-10A teñidas con azul de Prusia. (a) Células control. (b) Células incubadas con NPMs DMSA 0.4 mg Fe ml⁻¹ durante 24 h. Barra de escala: 10 μ m. (B) Imágenes al TEM de células MCF-10A interaccionando con NPMs DMSA a 0.4 mg Fe ml⁻¹. (a) Célula con agregados de NPs en el citoplasma. Barra de escala: 5 μ m. (b) Macropinocitosis. Barra de escala: 200 nm. (c) Endocitosis mediada por clatrina. Barra de escala: 100 nm. (C) Morfología celular mediante rojo neutro y Hoechst-33258. (a,a') Células HeLa control. (b,b') Células incubadas con NPMs DMSA a 0.4 mg Fe ml⁻¹ durante 24 h. Barra de escala: 10 μ m. (D) Caracterización cualitativa de la producción de ROS mediante el ensayo DA-DCFH. Barra de escala: 50 μ m. (a,a') Células incubadas con DMSA 0.4 mg Fe ml⁻¹ durante 24 h y observadas en microscopía de campo claro y fluorescencia, respectivamente. (E) Ensayo de viabilidad del MTT 24 h después del tratamiento con NPMs DMSA a 0.4 mg Fe ml⁻¹ en células MCF-10A.



Capítulo 2: Nanopartículas magnéticas.

Transporte y liberación de fármacos



Una vez confirmado que las nanopartículas magnéticas revestidas de DMSA se acumulaban con una elevada eficacia en el interior de las células tumorales en cultivo, y además eran biocompatibles, se les unió el fármaco doxorubicina mediante inmovilización covalente, empleando para ello, tres tipos de enlaces con diferente sensibilidad a distintos parámetros: i) a ambiente reductor (que denominaremos O-DOX), ii) a pH o M-DOX y iii) sensible a ambos factores (I-DOX). Como se ha comentado anteriormente, la acción citotóxica de la doxorubicina se ejerce en el núcleo, por lo que resultaba imprescindible detectar si la doxorubicina se liberaba de las nanopartículas magnéticas y si podía alcanzar el núcleo celular. Estos ensayos se realizaron en distintas líneas celulares establecidas de cáncer mama, pero principalmente en MDA-MB-231, y en un cultivo celular primario procedente de una muestras clínica.

1. Detección de la liberación de la doxorubicina

Los estudios en microscopía de fluorescencia, para detectar la localización subcelular de la DOX, indicaron que, con las tres formulaciones diferentes, el fármaco permanecía mayoritariamente unido a las NPMs, inmediatamente después de las 24 h de incubación, aunque también pudo detectarse una fluorescencia roja difusa en el núcleo y en el citoplasma de las células. Sin embargo, a las 72 h después del tratamiento, la DOX de las muestras MNP-O-DOX y MNP-M-DOX sólo aparecía unida a las NPMs, mientras que en el caso de la muestra MNP-I-DOX parte de la fluorescencia roja de la DOX continuaba localizada en el núcleo (ver *Figura 56*) y por lo tanto la DOX se seguía liberando de las NPMs. Las células control y las incubadas con las NPMs revestidas de DMSA no mostraron ninguna señal de fluorescencia roja (imágenes no mostradas).

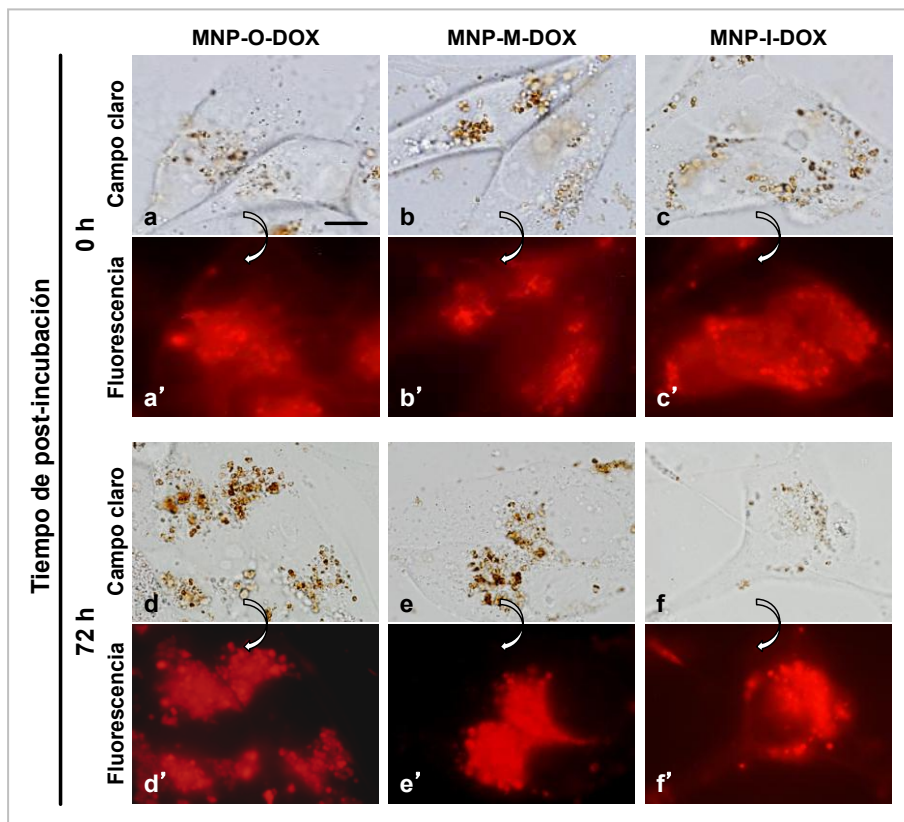


Figura 56.- Localización intracelular de las NPMs funcionalizadas con DOX en células MDA-MB-231 observadas en microscopía de campo claro y fluorescencia. (a,a') Células incubadas con MNP-O-DOX durante 24 h; (b,b') con MNP-M-DOX; y (c,c') con MNP-I-DOX. (d-f) y (d'-f') Células observadas en las mismas condiciones que a-c y a'-c' tras una post-incubación de 72 h. Barra de escala: 15 μ m.

2. Efectos citotóxicos inducidos por las nanopartículas unidas a doxorrubicina

2.1. Descenso de la densidad celular y aumento del tamaño celular

Los efectos citotóxicos inducidos por la incubación con las diferentes muestras de NPMs unidas a la DOX, se evaluaron mediante la captura de imágenes usando un microscopio invertido a distintos tiempos de post-incubación: 0, 24, 48 y 72 h. De esta forma se pudo observar que la densidad celular en el cultivo aumentaba por las sucesivas divisiones celulares a medida que pasaban los días, tanto en las células control como en las células incubadas con NPMs revestidas de DMSA. Sin

embargo, no se detectó un incremento similar en cultivos preincubados con las diferentes formulaciones de la inmovilización covalente, acentuándose este descenso de la densidad celular en células incubadas con MNP-I-DOX. Asimismo, se visualizó un significativo aumento del tamaño celular en relación a los controles o células incubadas con NPMs (ver *Figura 57*). Sólo se muestran las imágenes a las 72 h de post-incubación por ser las más significativas.

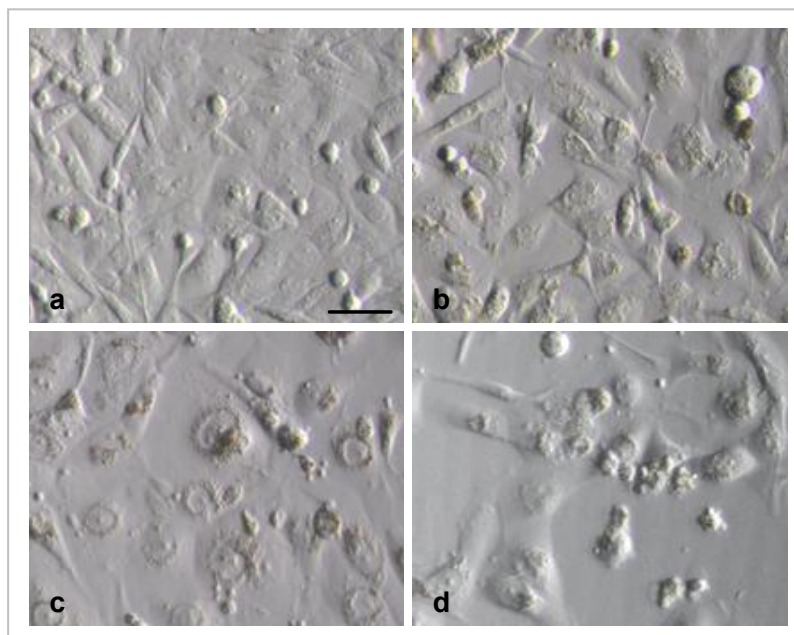


Figura 57.- Células MDA-MB-231 observadas al microscopio invertido tras 72 h de post-incubación. (a) Células control. (b) Células incubadas con MNP-O-DOX. (c) Células tratadas con MNP-M-DOX. (d) Células incubadas con MNP-I-DOX. Barra de escala: 50 μ m.

2.2. Detección de poliploidía, mitosis aberrantes y apoptosis

Las diferentes alteraciones morfológicas inducidas por la incubación con NPMs que llevaban unida covalentemente la DOX, por medio de diferentes tipos de enlaces, se visualizaron mediante la tinción con azul de Prusia a las 72 h de post-incubación. Además del aumento de tamaño celular, se detectaron, mayoritariamente, células gigantes y multinucleadas en células tratadas con MNP-O-DOX y MNP-M-DOX, y células gigantes pero con un único núcleo en las tratadas con MNP-I-DOX (*Figura 58*

A). Asimismo, se observaron metafases alteradas (Figura 58 B) y células con morfología apoptótica: núcleo condensado y fragmentado (Figura 58 C). No se muestra la imagen de células incubadas con las NPMs sin doxorubicina ya que su morfología era similar a la de las células control.

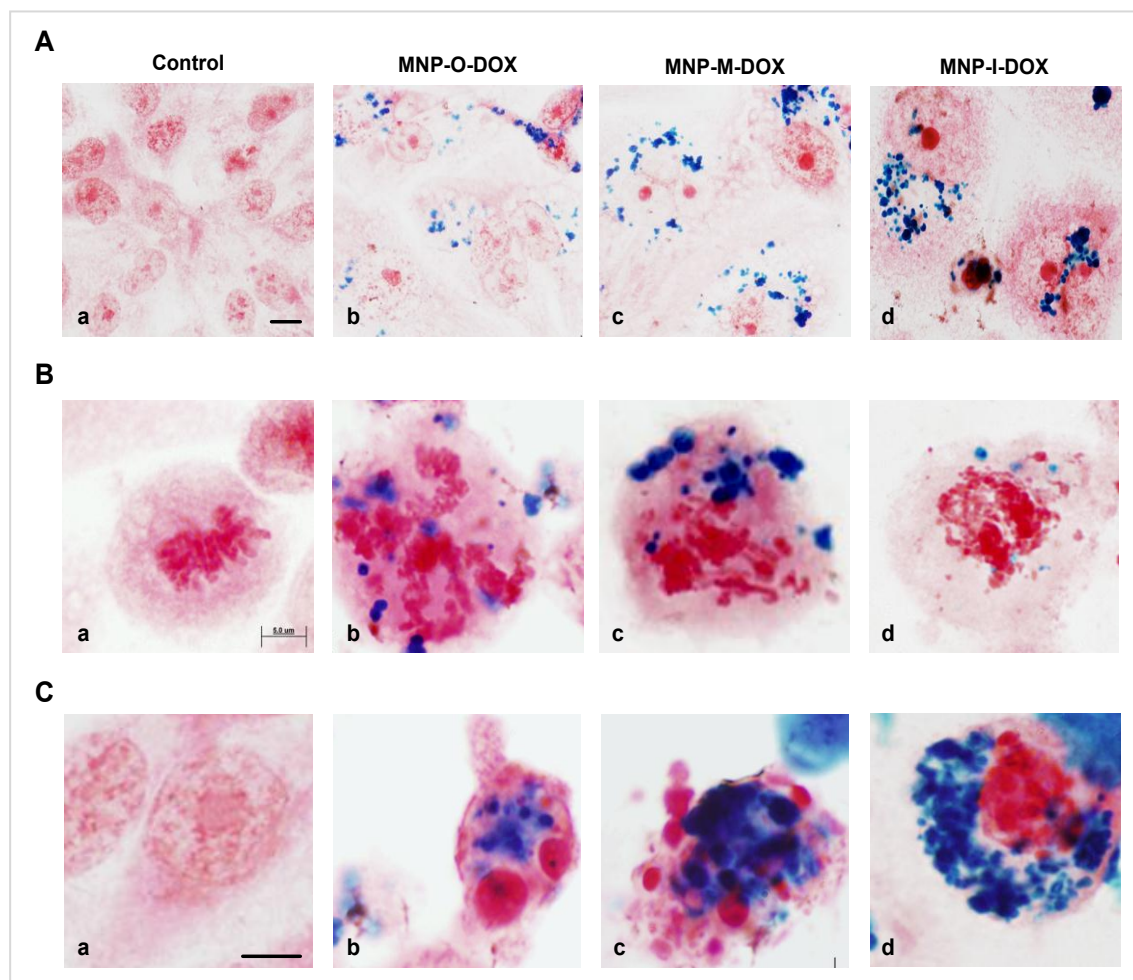


Figura 58.- Análisis morfológico mediante la tinción del azul de Prusia tras 72 h de post-incubación. (A) Poliploidía. (a) Células control. (b) Células incubadas con MNP-O-DOX; (c) con MNP-M-DOX; y (d) con I-DOX. Barra de escala: 10 μ m. (B) Mitosis aberrantes. Mismas condiciones que (A). Barra de escala: 5 μ m. (C) Apoptosis. Mismas condiciones que (A). Barra de escala: 5 μ m.

Posteriormente, se llevó cabo un recuento del porcentaje de células poliploides, índices mitóticos y células con morfología apoptótica a las 72 h de post-incubación en estas mismas muestras. Como se recoge en la *Tabla 7*, los porcentajes de células poliploides presentes en los cultivos aumentaban de $1.3 \pm 1.5\%$ en células control hasta $76.0 \pm 5.7\%$ en células tratadas; los índices mitóticos de $3.1 \pm 1.0\%$ en el control hasta un $9.5 \pm 1.4\%$; y los porcentajes de células apoptóticas detectadas en los cubreobjetos donde se encontraban desde un $1.1 \pm 1.0\%$ en el control hasta un $15.5 \pm 4.0\%$.

Tabla 7.- Porcentajes de células con diferente morfología celular a las 72 h de post-incubación.

Muestras	Células gigantes (%)	Índice mitótico (%)	Células apoptóticas (%)
Control	1.3 ± 1.5	3.1 ± 1.0	1.1 ± 1.0
MNP-O-DOX	38.9 ± 6.7	3.7 ± 1.2	4.6 ± 2.5
MNP-M-DOX	76.0 ± 5.7	9.5 ± 1.4	7.1 ± 2.9
MNP-I-DOX	68.7 ± 5.9	3.5 ± 1.1	15.5 ± 4.0

3. Reducción de la viabilidad celular

La citotoxicidad de los diferentes tratamientos con DOX unida covalentemente se evaluó mediante el ensayo colorimétrico del MTT a dos tiempos de post-incubación: 0 y 72 h. En la *Figura 59* se han representado sólo los resultados obtenidos a las 72 h por tratarse de los datos más significativos de este estudio. Se ha podido comprobar que las células tratadas con nanopartículas sin doxorrubicina (MNPs) no presentaban una reducción significativa de la viabilidad a las 72 h de post-incubación. Por el contrario, se observó un descenso de la supervivencia de las células MDA-MB-231 incubadas con la muestra MNP-O-DOX (84.3% células viables). Asimismo, este descenso fue bastante notable con las muestras MNP-M-DOX (50.3% células viables) y sobre todo, con MNP-I-DOX (40.6% células viables).

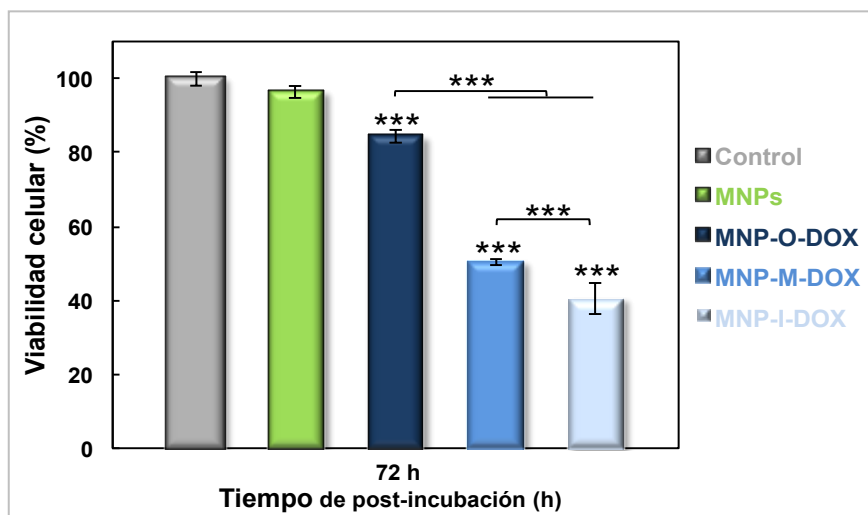


Figura 59.- Viabilidad de las células MDA-MB-231 tras 72 h de post-incubación con los distintos tratamientos, analizada mediante el ensayo del MTT.

Una vez analizados todos los datos obtenidos, se seleccionaron las MNP-I-DOX para continuar los experimentos ya que, además de continuar liberándose la doxorrubina de las nanopartículas hasta las 72 h de post-incubación, es la que inducía una mayor reducción de la viabilidad celular (60% de muerte celular) pudiéndose observar un número significativo de células con morfología apoptótica.

4. Análisis del citoesqueleto

4.1. Alteraciones en la distribución de los microtúbulos

El efecto de la internalización de la muestra MNP-I-DOX en los MTs se analizó mediante inmunofluorescencia indirecta para α -tubulina y contratinción del ADN con Hoechst-33258. Como se puede observar en la *Figura 60*, las células MDA-MB-231 incubadas con MNP-I-DOX presentaban husos mitóticos multipolares con los cromosomas desplazados de la placa ecuatorial, a las 72 h de post-incubación. Asimismo, se visualizaron células con un tamaño celular muy superior al de las

células control, que suelen denominarse con el término de “gigantes”, pero presentaban los MTs interfásicos sin alteraciones. Mediante la contratinción con Hoechst-33258 se evidenció que la mayoría de estas células gigantes tenían un único núcleo de gran tamaño. Con excitación verde se pudo observar parte de la fluorescencia roja de la DOX localizada en el núcleo y unida a las NPMs, cuando se visualizaron en microscopía de campo claro (ver *Figura 61 b,b'*). Además de las células con gran tamaño, también se observaron células con un tamaño reducido y una morfología redondeada, sin una organización en la red de MTs y cuyos núcleos estaban condensados y fragmentados (típica de células apoptóticas). Con excitación verde también se pudo apreciar la fluorescencia roja de la DOX localizada tanto en el núcleo como unida a las NPMs (ver *Figura 61 c,c'*).

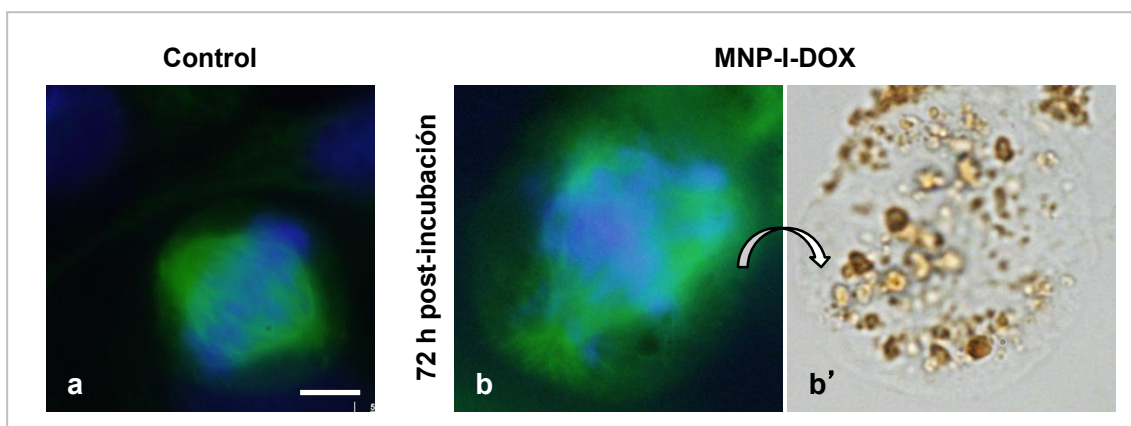


Figura 60.- Imágenes de células teñidas mediante inmunofluorescencia indirecta para α -tubulina y contratinción con Hoechst-33258. (a) Metafase de célula control. (b,b') Metafase de células incubadas con MNP-I-DOX a las 72 h de post-incubación observada en microscopía de fluorescencia y campo claro, respectivamente. Barra de escala: 5 μ m.

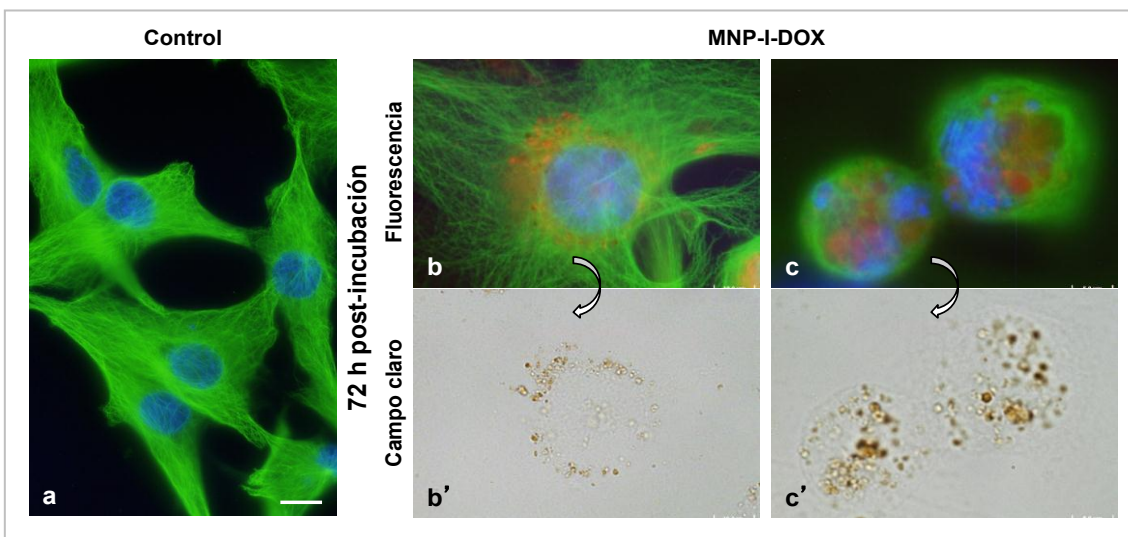


Figura 61.- Imágenes de células teñidas mediante inmunofluorescencia indirecta para α -tubulina y contratinción con Hoechst-33258 tras 72 h de post-incubación. (a) Células control. (b,b') Célula en interfase incubada con MNP-I-DOX observada en microscopía de fluorescencia y campo claro, respectivamente. (c,c') Células en apoptosis preincubadas con MNP-I-DOX. Barra de escala: 10 μ m.

4.2. Alteración en la organización y distribución de los filamentos de actina

El efecto de la acumulación de la muestra MNP-I-DOX también afectó a la distribución de los filamentos de actina, que se analizó mediante marcaje con faloidina unida a Alexa Fluor® 555 y contratinción del ADN con Hoechst-33258. Como se muestra en la *Figura 62*, algunas de las células MDA-MB-231 preincubadas con MNP-I-DOX y visualizadas a las 72 h de post-tratamiento, mostraban un tamaño celular reducido, con morfología redondeada y carecían de fibras de estrés que recorren la célula de un contacto focal a otro. Mediante la contratinción del ADN con Hoechst-33258 se pudo observar que los núcleos estaban condensados y fragmentados. Las células tratadas con NPMs magnéticas revestidas de DMSA sin doxorrubina no son mostradas por tener la misma organización y distribución que los filamentos de actina de las células control.

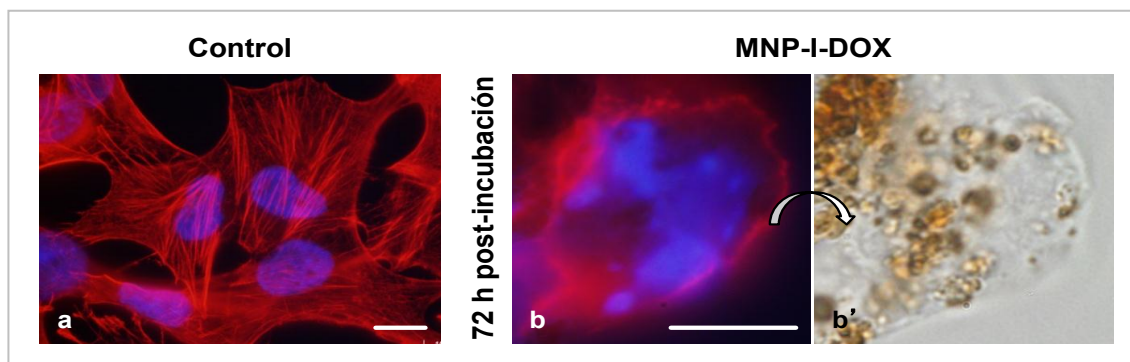


Figura 62.- Imágenes de células teñidas mediante faloidina-Alexa Fluor® 555 y contratinción con Hoechst-33258. (a) Células control. (b,b') Célula apoptótica tratada con MNP-I-DOX a las 72 h de post-incubación observada en microscopía de fluorescencia y campo claro, respectivamente. Barra de escala: 10 μ m.

5. Reducción de la actividad de las células madres tumorales

Una vez observado que a las 72 h de post-incubación sobrevivían una pequeña población de células al tratamiento con MNP-I-DOX (serían las células resistentes a la doxorrubicina), nos propusimos determinar qué porcentajes de ellas eran células madres tumorales/progenitoras y su actividad. Para ello, llevamos a cabo un recuento de las células “vivas” en monocapa a las 72 h de post-tratamiento mediante el ensayo del azul Tripán. Como muestra a gráfica de la *Figura 63*, se observó un descenso muy significativo del número de células viables, en las células tratadas con MNP-I-DOX con respecto al control y las incubadas con las nanopartículas sin funcionalizar (MNPs).

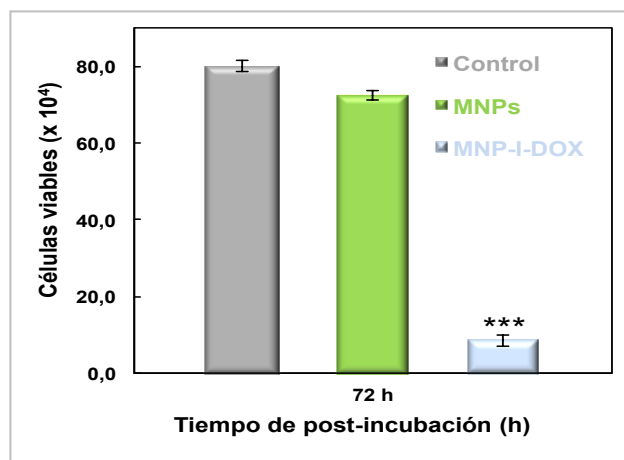


Figura 63.- Número total de células viables en monocapa a las 72 h de post-incubación.

A continuación, se realizó el ensayo de las mamoesferas para determinar la actividad de las células madres tumorales/progenitoras presentes en el cultivo celular, ya que sólo éstas serían capaces de formar esferas. Como muestra la *Figura 64 A*, una disminución en el número de mamoesferas (0.7 ± 0.2), pequeña pero significativa, se observó en las células tratadas con MNP-I-DOX con respecto al control (1.0 ± 0.1) o incubadas con MNPs y (1.0 ± 0.1). Estos resultados sugieren que la DOX era capaz de inactivar a estas células madres tumorales/progenitoras. Asimismo, el tamaño de las mamoesferas eran menor y las células que formaban dichas mamoesferas tenían un tamaño mayor con respecto al control. Además, se detectó fluorescencia roja correspondiente a la DOX en el interior de las células de las mamoesferas (ver *Figura 64 B*).

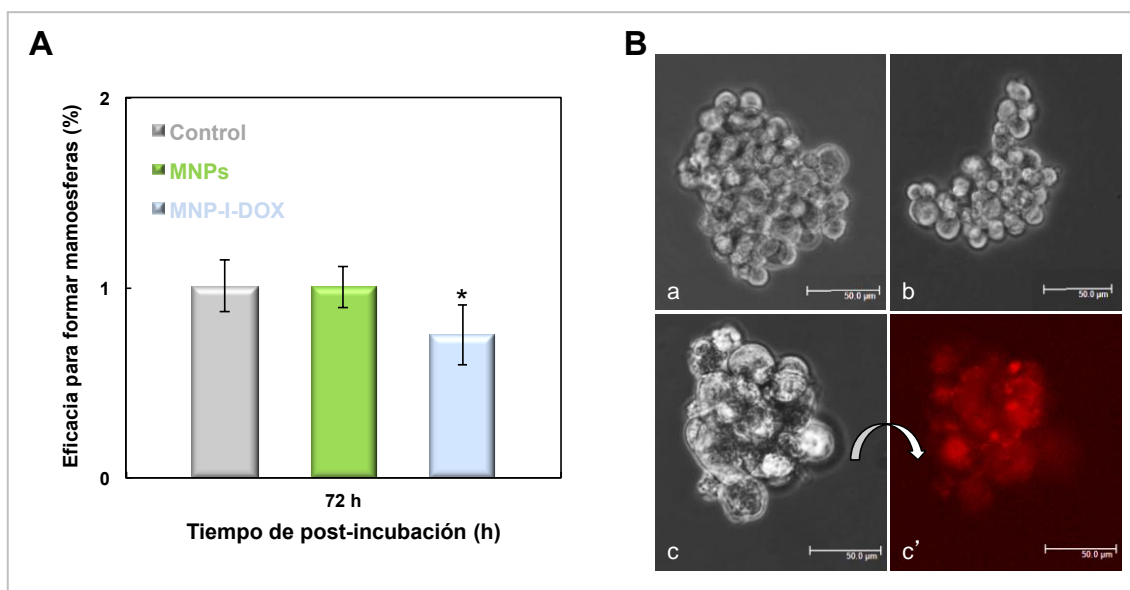


Figura 64.- Células MDA-MB-231 forman mamoesferas a las 72 h de post-incubación. (A) Eficacia para formar mamoesferas con los diferentes tratamientos. (B) Imágenes de mamoesferas. (a) Células control observadas en campo oscuro. (b) Células incubadas con MNPs observadas en campo oscuro. (c,c') Células tratadas con MNP-I-DOX, observadas en microscopía de campo oscuro y fluorescencia, respectivamente. Barra de escala: 50 μm .

6. Análisis de secciones de mamoesferas incluidas en parafina

6.1. Alteración en la morfología general de las células que formaban las mamoesferas

Los estudios morfológicos de las secciones de las mamoesferas incluidas en parafina se realizaron a las 72 h de post-incubación mediante tinciones con hematoxilina-eosina y azul de Prusia. La *Figura 65 A* muestra secciones de las diferentes muestras teñidas con hematoxilina-eosina donde se observaban las NPMs en forma de puntos ocre en el citoplasma de las células que formaban esa mamoesfera, mientras que en la *Figura 65 B*, las secciones estaban teñidas con azul de Prusia y las NPMs aparecían como puntos azules. Las células de las mamoesferas tratadas con NPMs sin doxorrubicina (MNPs) tenían una morfología similar a la de las células del control. Sin embargo, las células que formaban las mamoesferas tratadas con MNP-I-DOX tenían un tamaño celular mayor que las del control y la mayoría presentaban una morfología alterada o apoptótica.

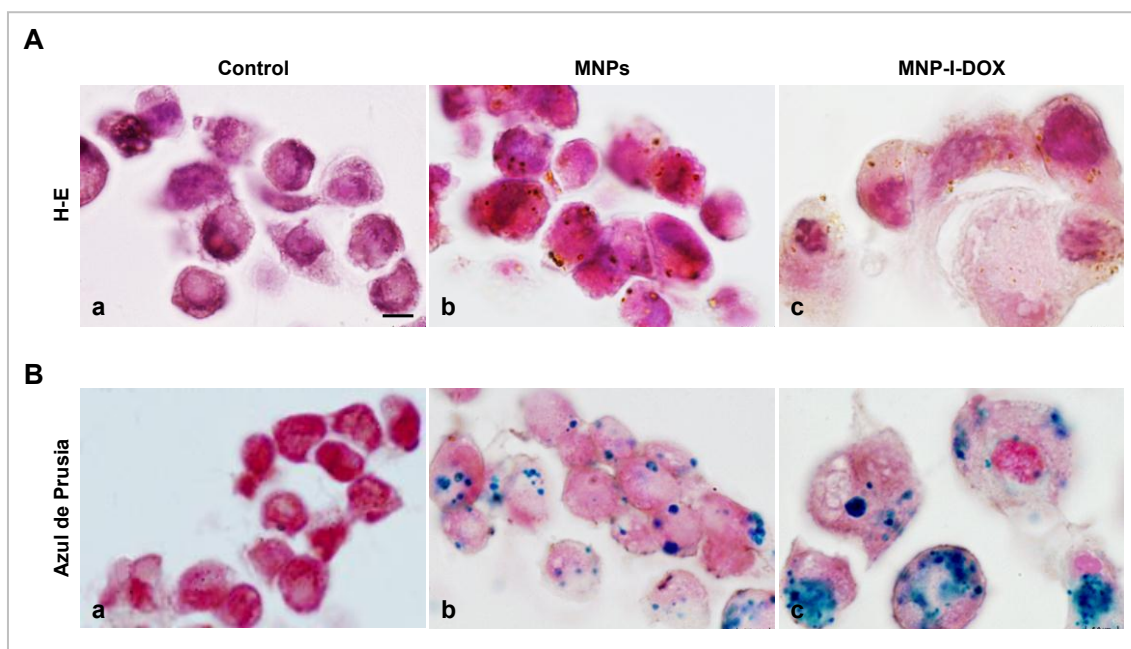


Figura 65.- Secciones de mamoesferas incluidas en parafina después de 72 h de post-tratamiento (A) Tinción con hematoxilina-eosina. (a,a') Sección de células control; (b,b') incubadas con MNPs; y (c,c') tratadas con MNP-I-DOX. (B) Tinción con azul de Prusia en las mismas condiciones que (A). Barra de escala: 5 μ m.

6.2. Alteración en la organización y distribución de los microtúbulos

El estudio de la organización y distribución de los MTs de las células que formaban las mamoesferas se realizó mediante una inmunofluorescencia indirecta para α -tubulina y una contratinción con Hoechst-33258 para el ADN, a las 72 h del post-tratamiento de secciones de mamoesferas con los diferentes tratamientos. Como se puede observar en la *Figura 66 a*, los MTs de las células que formaban las mamoesferas sin tratar (controles), aparecían en forma de puntos y de líneas gruesas de color verde por toda la célula. De forma más detallada se puede visualizar en la imagen aumentada de una célula (*Figura 66 b*). Asimismo, las células de las mamoesferas que fueron incubadas con NPMs sin doxorrubicina mostraban el mismo patrón de distribución que las células de las mamoesferas control (*Figura 66 c*). Sin embargo, las células de las mamoesferas que fueron preincubadas con MNP-I-DOX mostraban un punteado verde muy leve y difuso y otras carecían de él, por lo que estas células tenían alterados los MTs o carecían de ellos. Además, mediante la contratinción con Hoechst-33258, se visualizaron los núcleos condensados y fragmentados (ver *Figura 66 (d,e)*).

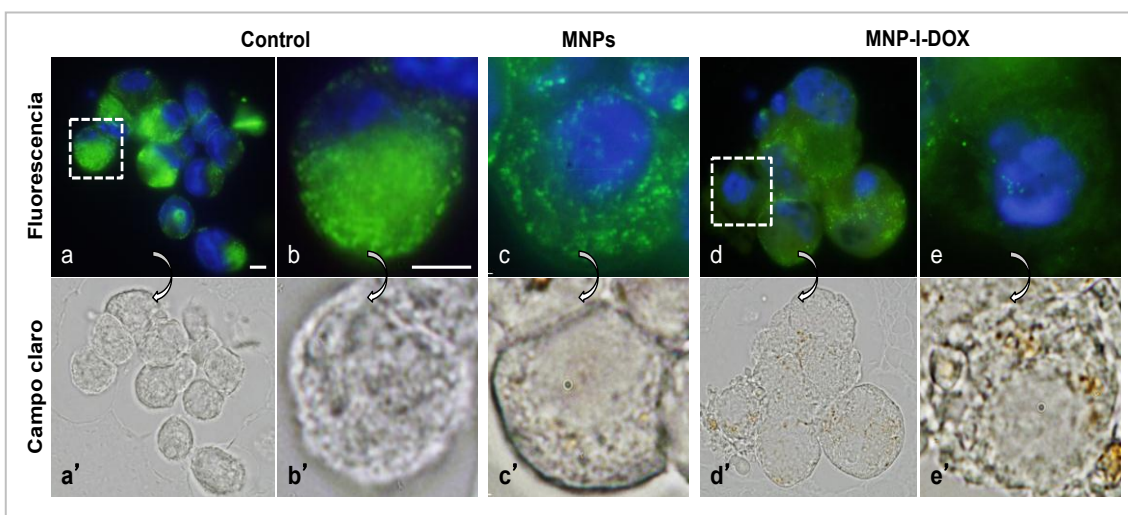


Figura 66.- Secciones de mamoesferas incluidas en parafina después de 72 h de post-incubación e inmunotinción indirecta para α -tubulina y contratinción con Hoechst-33258 visualizadas en fluorescencia y campo claro, respectivamente. (a,a') Control. (c,c') Tratadas con NPMs. (d,d') Incubadas con MNP-I-DOX. (b,b') y (e,e') Imágenes ampliadas de a,a' y d,d', respectivamente. Barra de escala: 5 μ m.

6.3. Muerte celular apoptótica

6.3.1 Liberación del citocromo C

Para confirmar que las células de las mamoesferas tratadas con MNP-I-DOX eran sensibilizadas mediante un mecanismo de muerte celular por apoptosis, se realizó una inmunofluorescencia indirecta para citocromo C y una contratinción con Hoechst-33258 a las 72 h de post-tratamiento. Como se aprecia en la *Figura 67*, las células de las mamoesferas control, mostraban el citocromo C localizado en las mitocondrias, apareciendo en forma de puntos verdes. Sin embargo, en las células de las mamoesferas preincubadas con MNP-I-DOX, el citocromo C aparece de color verde difuso debido a que se liberaba de las mitocondrias y se distribuía por el citoplasma de las células. Mediante la contratinción con Hoechst-33258 se pudo observar que las células presentaban el núcleo condensado y fragmentado. Asimismo, por medio de la microscopía de campo claro se pudieron visualizar las NPMs como puntos color ocre en el citoplasma de las células. Para poder observar el detalle, la *Figura 67 b,d* muestra una célula en mayores aumento del control y del tratado.

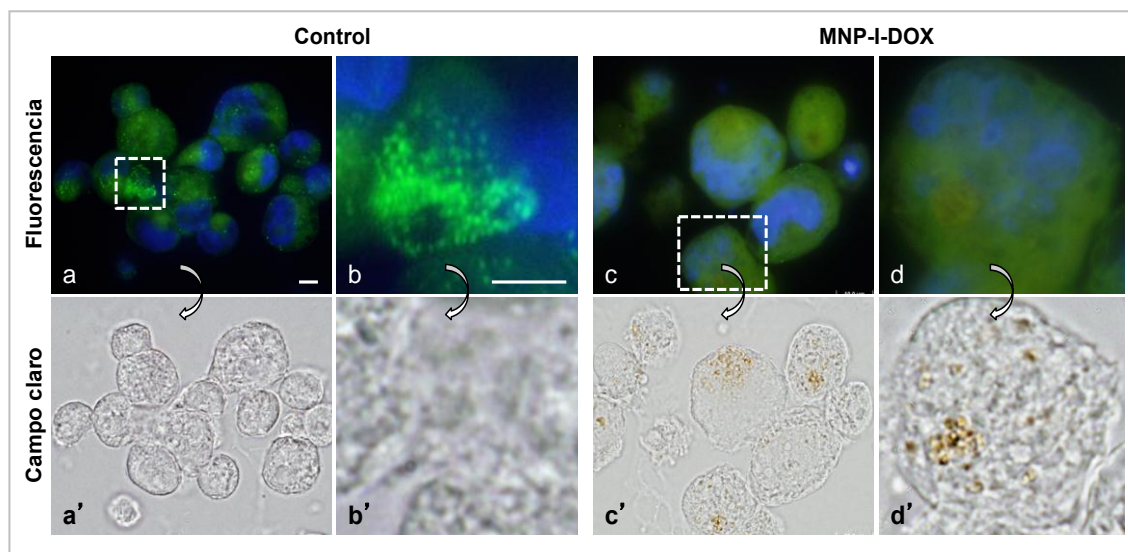


Figura 67.- Secciones de mamoesferas incluidas en parafina después de 72 h de post-incubación e inmunotinción indirecta para citocromo C y contratinción con Hoechst-33258 visualizadas en fluorescencia y campo claro, respectivamente. (a,a') Control. (c,c') Tratadas con MNP-I-DOX. (b,b') y (d,d') Imágenes ampliadas de a,a' y c,c'. Barra de escala: 5 μ m.

6.3.2 Activación de la caspasa-3

Una vez confirmado que se induce la liberación del citocromo C desde la mitocondria, el siguiente paso fue analizar si se inducía la activación de la proteína caspasa-3. Para ello, se realizó una inmunofluorescencia indirecta para caspasa-3 activa y una contratinción con Hoechst-33258 a las 72 h post-tratamiento en las secciones de mamoesferas tratadas con las diferentes muestras. La *Figura 68 a* muestra las células de la mamoesfera sin tratar donde se aprecia una baja intensidad de fluorescencia roja indicando la ausencia de caspasa-3 activa. Sin embargo, las células de la mamoesfera preincubadas con MNP-I-DOX presentaban una elevada intensidad de fluorescencia roja en el citoplasma, es decir, eran positivas para la caspasa-3. Mediante la contratinción con Hoechst-33258 se pudo observar que las células presentaban el núcleo condensado y fragmentado (ver *Figura 68 c*). Para poder observar con mayor detalle los resultados, la *Figura 68 b,d* muestra una célula de cada condición, a mayores aumentos. Las células de la mamoesfera incubadas con NPMs sin doxorrubina no se muestran ya que presentan el mismo patrón que las células de la mamoesfera control.

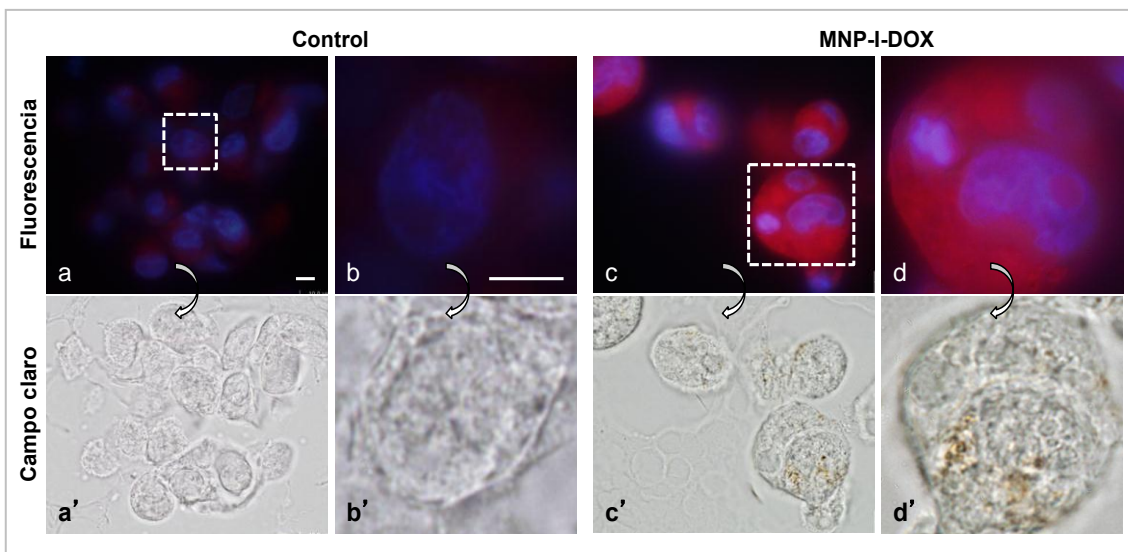


Figura 68.- Secciones de mamoesferas incluidas en parafina después de 72 h de post-incubación e inmunotinción indirecta para caspasa-3 activa y contratinción con Hoechst-33258 visualizadas en fluorescencia y campo claro, respectivamente. (a,a') Control. (c,c') Tratadas con MNP-I-DOX. (b,b') y (d,d') Imágenes ampliadas de a,a' y c,c'. Barra de escala: 5 μ m

Una vez cuantificada la actividad de las células madre tumorales en la línea celular establecida de cáncer de mama MDA-MB-231, se pasó a cuantificar dicha actividad en las células de una muestra clínica, BB3RC79, extraída de una paciente con cáncer de mama metastásico. Estas células poseían el mismo perfil génico que la línea celular establecida de cáncer de mama MDA-MB-231, es decir, eran triple negativo (ER- PR- HER2-).

Las células BB3RC79 cultivadas en monocapa se incubaron con las NPMs sin doxorrubina (MNPs) y unidas a doxorrubina (MNP-I-DOX) durante 24 h e inmediatamente se realizó el ensayo de las mamoesferas. Como en el caso anterior, lo primero fue el recuento de células “vivas” mediante el test del azul Tripán. Se obtuvieron resultados similares a los de la línea celular establecida MDA-MB-231, una reducción significativa de la viabilidad celular con respecto al control y células tratadas con MNPs (ver *Figura 69 A*). Las células se fotografiaron en microscopía de campo oscuro, para visualizar la morfología general de las células y en fluorescencia para visualizar la fluorescencia roja de la DOX. Como muestra la *Figura 69 B*, las células incubadas con las nanopartículas sin doxorrubina tenían la misma morfología que las células control. Sin embargo, la mayoría de las células tratadas con MNP-I-DOX presentaban una morfología alterada y la doxorrubina se localizaba en el interior celular.

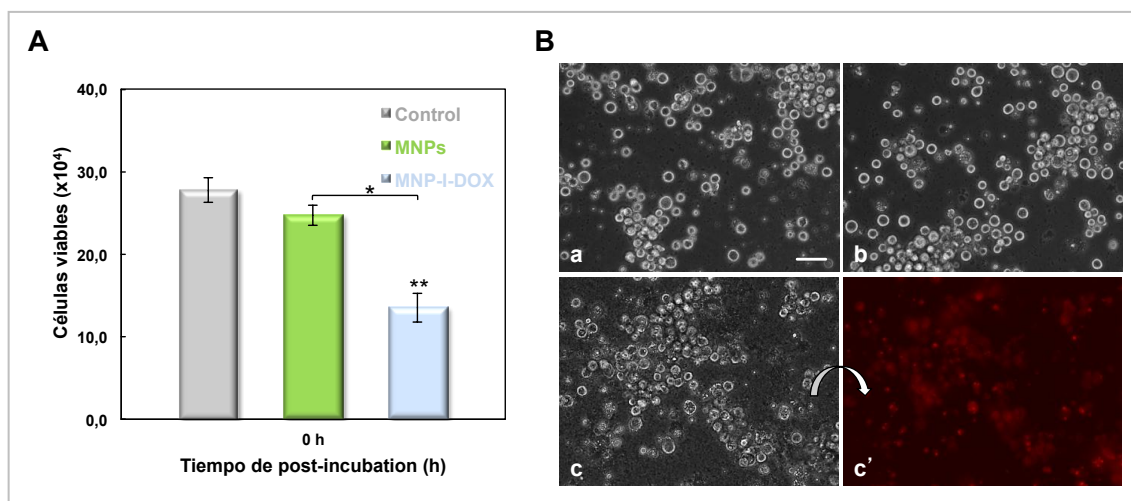


Figura 69.- Células BB3RC79 en monocapa a las 0 h de post- incubación. (A) Número total de células viables con los diferentes tratamientos. (B) Imágenes de: (a) células control observadas en microscopía de campo oscuro, (b) células incubadas con MNPs observadas en microscopía de campo oscuro y (c,c') células tratadas con MNP-I-DOX observadas en microscopía de campo oscuro y fluorescencia, respectivamente. Barra de escala: 50 µm.

A continuación se llevó a cabo el ensayo de las mamoesferas. Los resultados obtenidos también fueron similares a los de la línea celular establecida MDA-MB-231. Como se aprecia en la *Figura 70 A*, las células tratadas con MNP-I-DOX formaron un menor número de esferas (0.6 ± 0.1) con respecto a las células control (0.8 ± 0.1) e incubadas con MNPs (0.8 ± 0.1) a las 24 h del tratamiento. Asimismo, las células preincubadas con MNP-I-DOX que formaban la mamoesfera mostraban una morfología alterada, no tenían la forma redondeada como las de las células de la mamoesfera control o tratadas con MNPs. En la imagen de fluorescencia se pudo visualizar la DOX en el interior de las células que formaban la mamoesfera (ver *Figura 70 B*). En estas células procedentes de la muestra clínica ya se estaba produciendo una inactivación incluso a las 24 h de incubación.

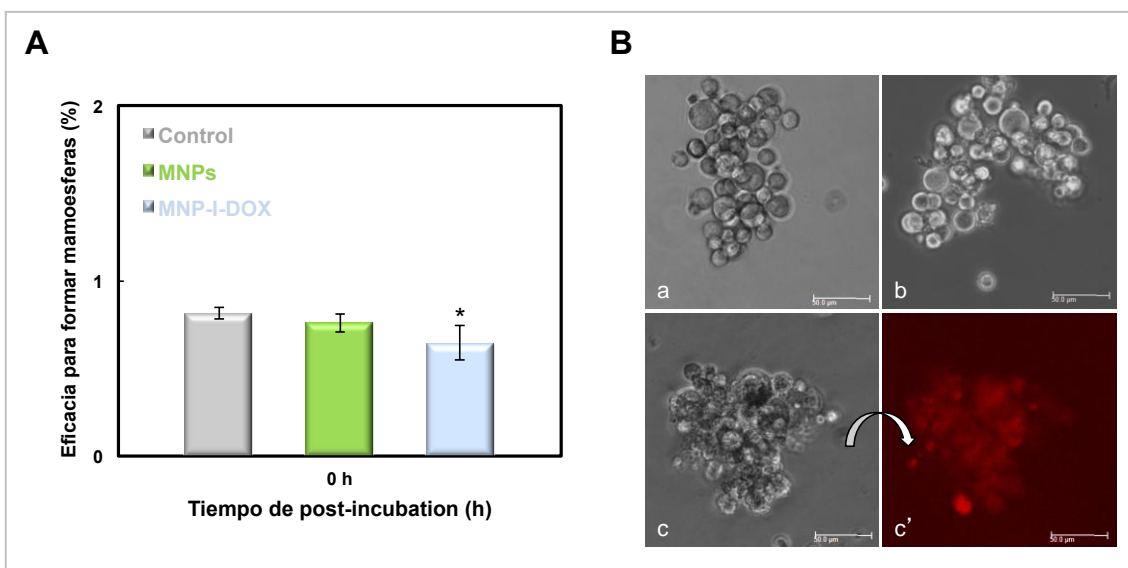
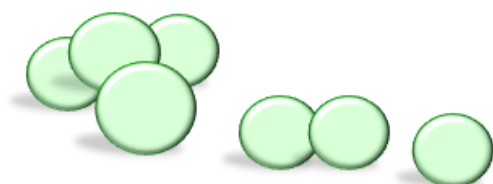
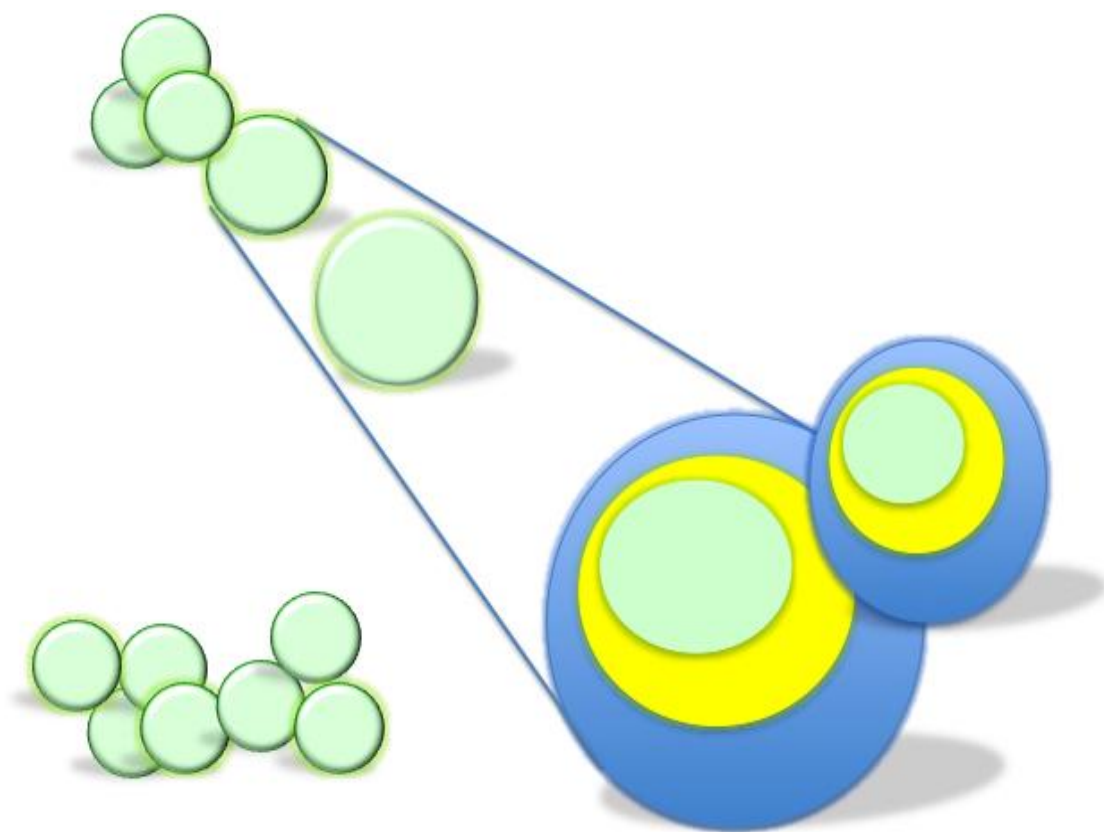


Figura 70.- Células BB3RC79 forman mamoesferas a las 24 h de incubación. (A) Eficacia para formar mamoesferas con los diferentes tratamientos. (B) Imágenes de mamoesferas. (a) Células control observadas en campo oscuro. (b) Células incubadas con MNPs observadas en campo oscuro. (c,c') Células tratadas con MNP-I-DOX, observadas en microscopía de campo oscuro y fluorescencia, respectivamente. Barra de escala: 50 μ m.



Capítulo 3: Nanopartículas magnéticas.

Hipertermia intracelular



1. Diferente sensibilidad al calentamiento de los distintos tipos celulares

Los primeros experimentos relacionados con la hipertermia fueron llevados a cabo en células HeLa, mediante la simulación (introduciendo las placas de los cultivos celulares) en un baño térmico a 44 °C durante 1 h. Los efectos mediados por este choque térmico se analizaron a las 24 y 48 h después del tratamiento, incluyendo la supervivencia celular mediante el ensayo del MTT. A continuación, se realizó un protocolo similar en las líneas de mama MCF-7, MDA-MB-231 y BT-474. Como muestra la *Figura 71*, las células HeLa fueron las menos afectadas por el incremento de la temperatura (~ 20% de muerte celular), si comparamos la sensibilidad entre las cuatro líneas celulares tumorales. Asimismo, las células BT-474 fueron las más sensibles (~ 50% de muerte celular), mientras que las células MCF-7 y MDA-MB-231 tenían un comportamiento similar (~ 30% de muerte celular), entre las células tumorales de mama.

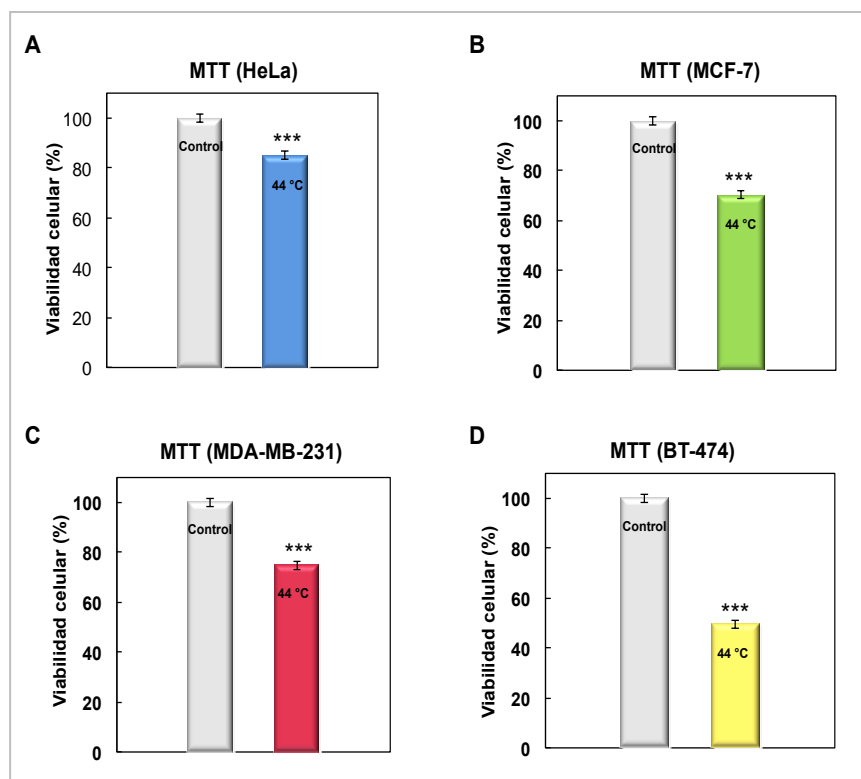


Figura 71.- Evaluación de la viabilidad mediante el ensayo del MTT. (A) Células HeLa. (B) Células MCF-7. (C) Células MDA-MB-231. (D) Células BT-474.

Asimismo, se analizó la morfología celular -mediante las tinciones de rojo neutro y Hoechst-33258- 24 h después del tratamiento. La *Figura 72 (a,a')* muestra las células control teñidas con rojo neutro y Hoechst-33258 calentadas en el mismo baño a 37 °C donde se observaba la morfología poligonal de las células HeLa en interfase y los núcleos normales. En la *Figura 72 (b,b')*, se aprecian células apoptóticas, metafases alteradas y células en interfases con núcleos que presentan una morfología alterada. Además, la mayoría de las células después del calentamiento perdían la adhesión al sustrato donde crecían y se iban desprendiendo progresivamente del mismo. La *Figura 72 c'* muestra células en apoptosis procedentes de las suspensiones -células que flotaban en el medio de cultivo- que fueron centrifugadas, fijadas y teñidas con Hoechst-33258.

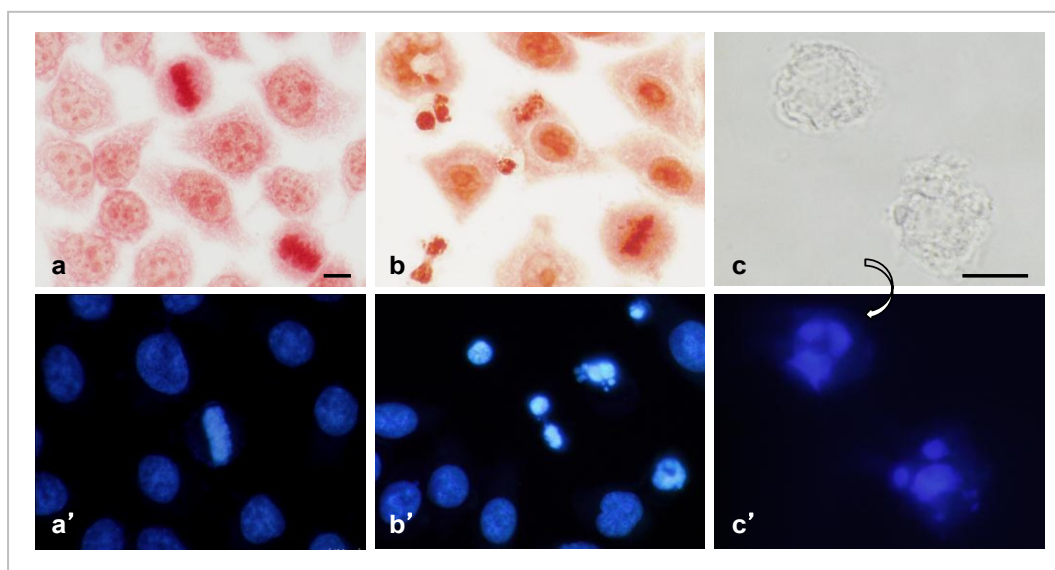


Figura 72.- Análisis morfológico de células HeLa calentadas en un baño térmico durante 1 h y fotografiadas a las 24 h. (a,a') Células controles, calentadas a 37 °C y teñidas con rojo neutro y Hoechst-33258, respectivamente. (b,b') Células calentadas a 44 °C y teñidas con rojo neutro y Hoechst-33258, respectivamente. (c,c') Suspensión de células calentadas a 44 °C, teñidas con Hoechst-33258 y visualizadas en campo claro y fluorescencia, respectivamente. Barra de escala: 10 μ m.

Resultados similares en cuanto a la morfología celular, se obtuvieron en las líneas celulares tumorales de mama MCF-7, MDA-MB-231 y BT-474. Como se aprecia en la *Figura 73 A y B*, gran parte de las células en interfase presentaban una morfología alterada y el núcleo con la cromatina más

condensada. Las metafases también eran anormales y un elevado número de células mostraba una morfología apoptótica. Además, en las células MDA-MB-231 se apreciaban algunas células gigantes. En las tres líneas celulares, se observaba una progresiva pérdida de adhesión al sustrato donde crecían después del calentamiento, siendo mayor en las células BT-474. Las células que se desprendían mostraban núcleos apoptóticos, condensados o incluso metafases alteradas, en el caso de las células MCF-7. Las imágenes de BT-474 no son mostradas por ser similares a las presentadas.

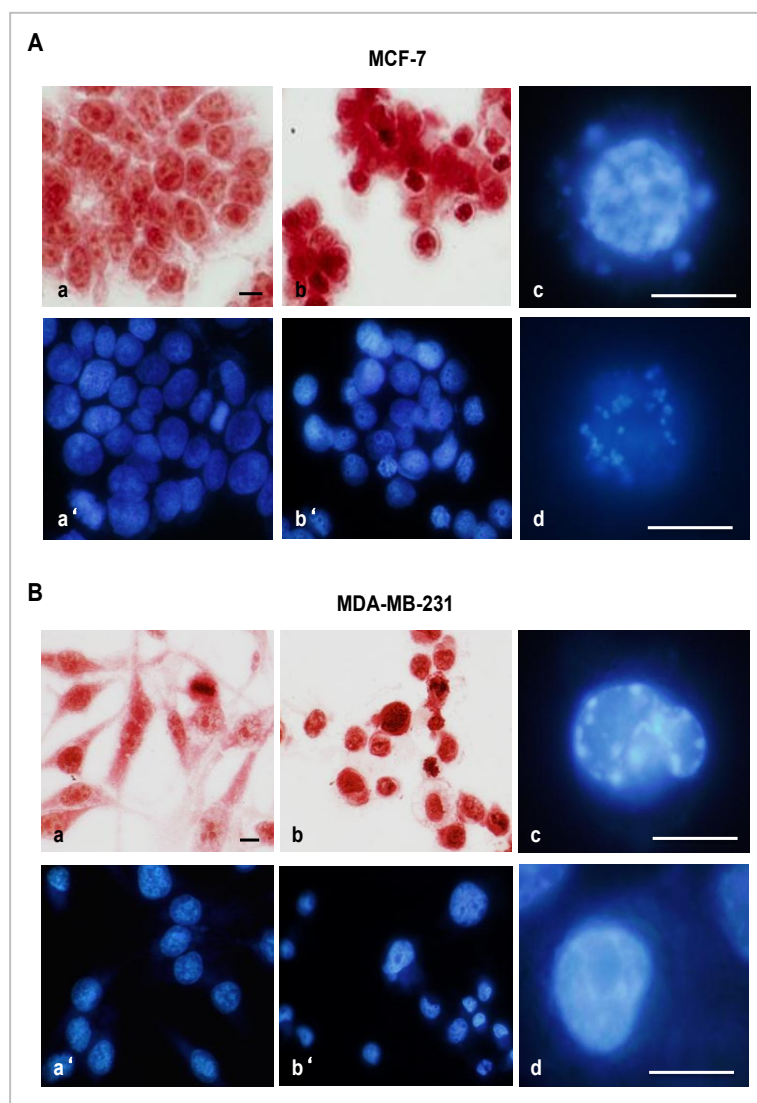


Figura 73.- Análisis de la morfología celular 24 h después del tratamiento. (A) Células MCF-7. (a,a') Células control teñidas con rojo y Hoechst-33258, respectivamente. (b,b') Células calentadas a 44 °C durante 1 h, teñidas con rojo y Hoechst-33258, respectivamente. (c,d) Suspensión celular de células calentadas a 44 °C y teñidas con Hoechst-33258. Barra de escala: 10 μ m. (B) Células MDA-MB-231 en la mismas condiciones que (A). Barra de escala: 10 μ m.

A este mismo intervalo de tiempo de post-tratamiento (24 h), se realizó una inmunofluorescencia indirecta para α -tubulina y contratinción del ADN con Hoechst-33258 para analizar si la elevación de la temperatura, afectaba a la organización de los MTs. Como se muestra en la *Figura 74*, la mayoría de las células que permanecían adheridas al sustrato, mostraban los MTs interfásicos con una morfología y distribución similar a los de las células control, a pesar de la elevación de la temperatura. Sin embargo, un reducido número de células sí que presentaban alterados los MTs, con un aspecto de ovillo, y el núcleo fragmentado. En cuanto a las células en metafase, se visualizaron cromosomas desplazados de la placa ecuatorial (ver *Figura 74 b''*).

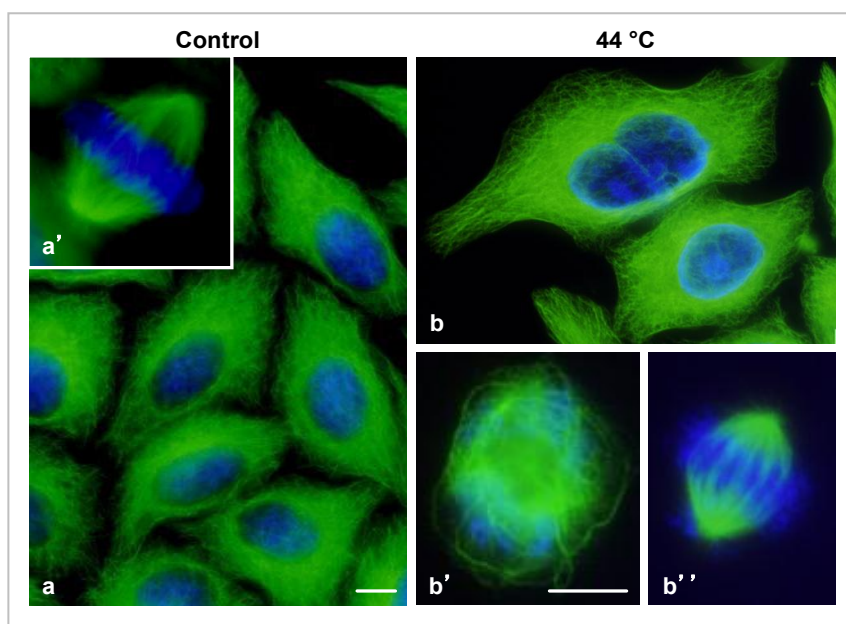


Figura 74.- Imágenes de inmunofluorescencia para α -tubulina y contratinción del ADN con Hoechst-33258 de células HeLa. (a,a') Interfases y metafase de células control, respectivamente. (b-b'') Interfases y metafase de células calentadas en un baño a 44 °C durante 1 h y fotografiadas a las 24 h del post-tratamiento, respectivamente. Barra de escala: 10 μ m.

Del mismo modo, se realizó una inmunofluorescencia para α -tubulina (contratinción del ADN con Hoechst-33258) para analizar los MTs de las líneas celulares de cáncer de mama, MCF-7, MDA-MB-231 y BT-474. Como se muestra en la *Figura 75 A*, una parte de las células MCF-7 calentadas a 44 °C durante 1 h y que aún seguían adheridas al sustrato, presentaban una morfología redondeada

cuyos MTs estaban fragmentados y los núcleos condensados. Asimismo, las células MDA-MB-231 tratadas en las mismas condiciones presentaban células redondeadas y encogidas con MTs alterados o bien carecían de ellos. Además, también se observaron células gigantes en interfase cuyos MTs presentaban una morfología similar al de las células control. Mediante la tinción con Hoechst-33258 se observó que un elevado número eran células multinucleadas (ver *Figura 75 B*). Finalmente, en la *Figura 75 C* se muestra que la mayoría de las células BT-474 en interfase, que formaban la periferia de las colonias, se redondeaban y presentaban los MTs alterados. Gran parte de ellas se desprendían del sustrato y terminaban muriendo por apoptosis.

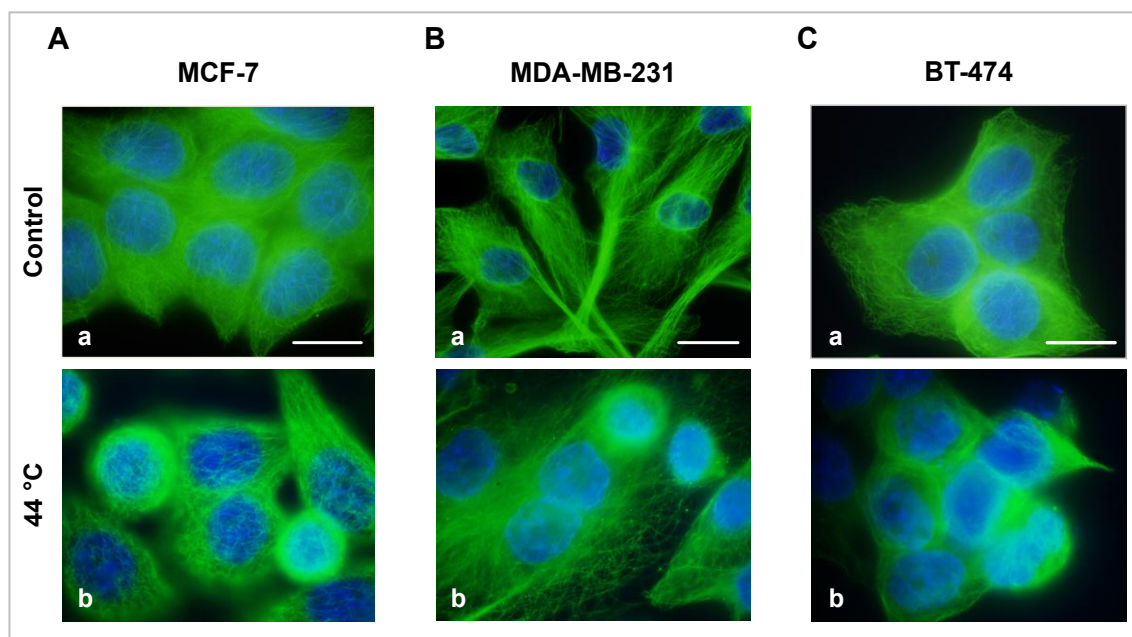
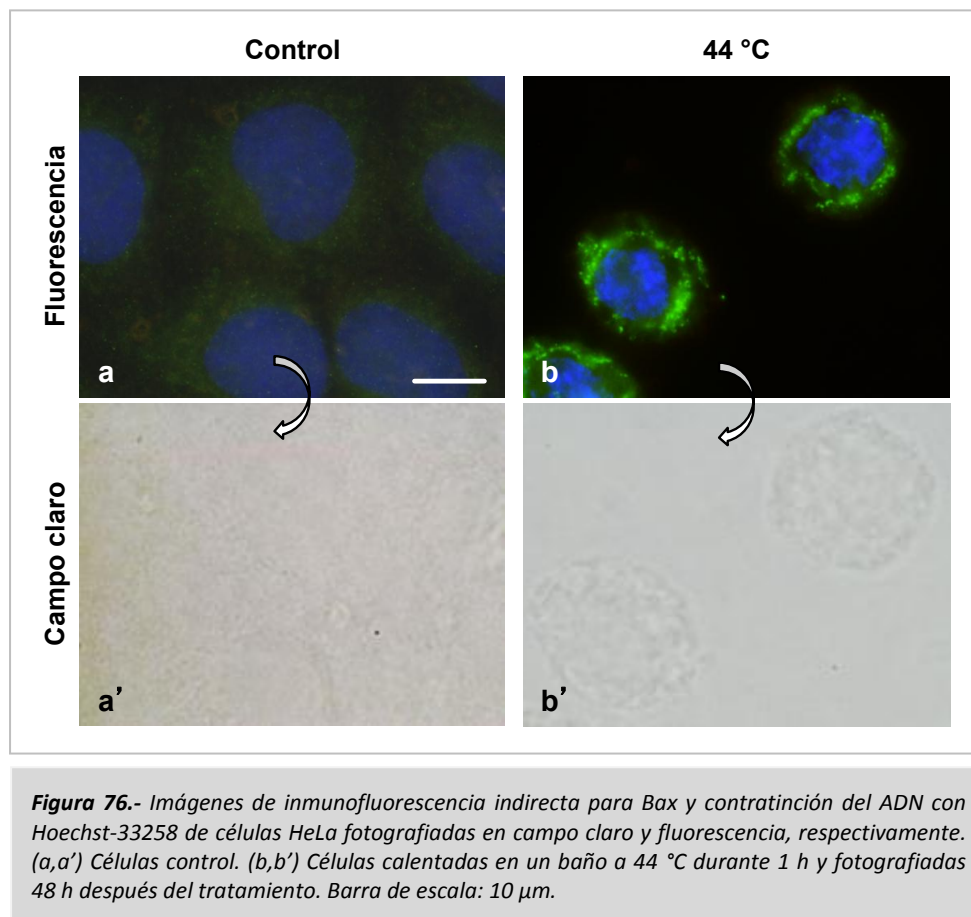


Figura 75.- Imágenes de inmunofluorescencia para α -tubulina y contratinción del ADN con Hoechst-33258. (A) Células MCF-7. (a) Células control calentadas a 37 °C durante 1 h. (b) Células calentadas a 44 °C durante 1 h y visualizadas 24 h después del tratamiento. (B) Células MDA-MB-231 y (C) Células BT-474 en las mismas condiciones que (A). Barra de escala: 10 μ m.

Asimismo, a las 48 h del post-tratamiento, se realizó una inmunofluorescencia indirecta para la proteína proapoptótica Bax (contratinción del ADN con Hoechst-33258) para analizar si se producía una relocalización en las mitocondrias debido a que se inducía el mecanismo de muerte celular por

apoptosis. Como muestra la *Figura 76*, la proteína tenía una localización citoplasmática en las células control (fluorescencia verde difusa), mientras que en las células tratadas se relocizaba en las mitocondrias (fluorescencia verde brillante y punteada).



Una vez analizado como respondían las diferentes líneas celulares tumorales al incremento de la temperatura, iniciamos los ensayos de hipertermia intracelular. Para estos ensayos se emplearon, en un primer momento, las NPMs revestidas de aminodextrano (AD), y después, las NPMs recubiertas de ácido dimercaptosuccínico (DMSA), ya que fueron las seleccionas en el Proyecto Europeo Multifun, para realizar todos los experimentos propuestos.

Los primeros experimentos de hipertermia intracelular con NPMs revestidas de AD se llevaron a cabo utilizando un prototipo de equipo instrumental diseñado y construido por el grupo de investigación del Dr. Rivero en el Instituto de Magnetismo Aplicado (IMA-UCM). Las células HeLa se incubaron durante 3 h con dichas NPMs a la concentración de $0.5 \text{ mg Fe mL}^{-1}$, y a continuación, se sometieron a un campo magnético alterno de 100 kHz y 150 G durante 30 min.

Como se comentó en el capítulo 1, a las 3 h de incubación ya se observaban gran cantidad de NPs en el interior de las células. El análisis de la morfología celular 24 h después del tratamiento combinado (NPMs AD + campo magnético alterno), demostró que un porcentaje muy significativo de las células ($\sim 40\%$) presentaban una morfología característica de la muerte celular por apoptosis (ver *Figura 77*). De este modo, pudimos detectar apoptosis tempranas: encogimiento y redondeamiento de las células con un núcleo condensado y fragmentado (*Figura 77 c*) o tardía: sólo quedan restos celulares debido a que la célula se ha desorganizado casi por completo (*Figura 77 d*).

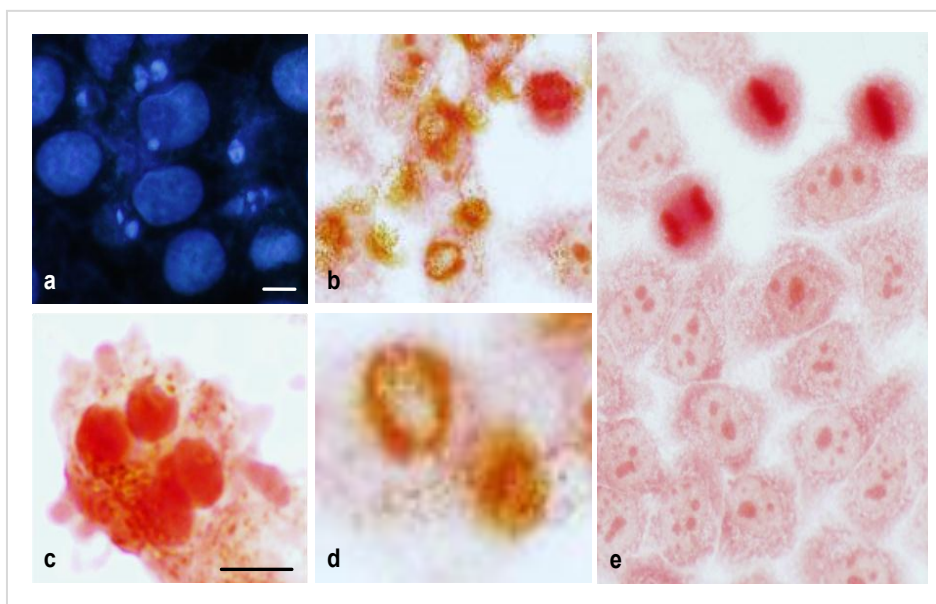


Figura 77.- Células HeLa incubadas durante 3 h con NPMs AD a $0.5 \text{ mg Fe mL}^{-1}$ y sometidas a un campo magnético alterno durante 30 min. (a) Tinción con Hoechst-33258. (b) Tinción con rojo neutro. (c) Célula apoptótica en etapa temprana. (d) Célula apoptótica en etapa tardía. (e) Células control. Barra de escala: $5 \mu\text{m}$.

Asimismo, en las células apoptóticas teñidas con rojo neutro se visualizaron las nanopartículas de color ocre dentro de las células apoptóticas. Es importante señalar que, las células no incubadas con NPMs AD pero sometidas sólo al campo magnético, presentaban una morfología similar a los controles no tratados (imágenes no mostradas). Estos prometedores resultados no pudieron continuarse con generadores de campos magnéticos alternos, debido a que dejó de funcionar el generador diseñado para esta experimentación.

Los experimentos de hipertermia intracelular prosiguieron con un equipo diseñado por el Dr. Terán y el Dr. Bollero pertenecientes al área de Magnetismo del Instituto Madrileño de Estudios Avanzados en Nanociencia (IMDEA Nanociencia).

Las células HeLa se incubaron con NPMs revestidas de DMSA a la concentración de 0.5 mg Fe ml⁻¹ durante 24 h y trascurrido ese tiempo se sometieron a un campo magnético alterno de 160 kHz y 420 G durante 15 min. Estas células se dejaron en el incubador y se analizaron morfológicamente 24 h después del tratamiento combinado (NPMs DMSA + campo magnético alterno).

Se obtuvieron resultados similares a los del primer experimento de hipertermia intracelular (incubadas con NPMs revestidas de AD). Como muestra la *Figura 78*, pudimos visualizar células con morfología apoptótica. Mediante la tinción con rojo neutro se detectaron células apoptóticas que presentaban una morfología redondeada, y además, seguían detectándose las nanopartículas de color ocre en el interior celular.

Asimismo, mediante la tinción con Hoechst-33258, pudimos apreciar que los núcleos estaban condensados y fragmentados. En estas mismas muestras se hicieron recuentos basados en las alteraciones morfológicas y se obtuvo que aproximadamente un 25 % de las células, mostraban características de la muerte celular por apoptosis. Es importante mencionar que las células no incubadas con NPMs revestidas de DMSA pero sometidas sólo al campo magnético, presentaban una morfología similar a los controles no tratados (imágenes no mostradas).

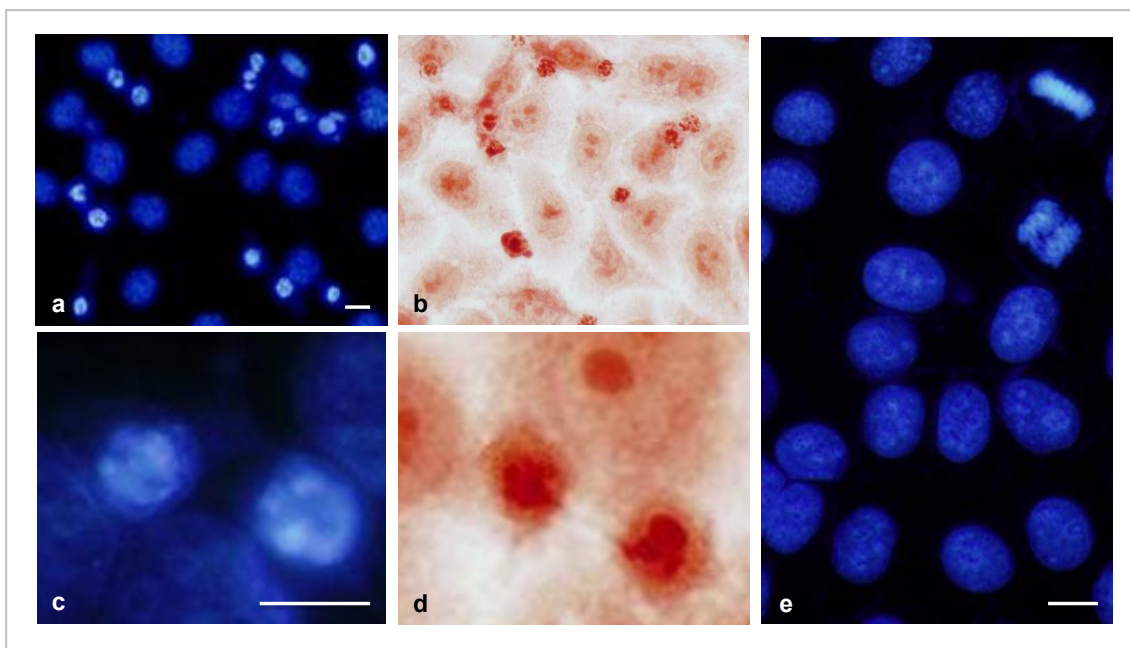


Figura 78.- Células HeLa incubadas durante 24 h con NPMs DMSA a $0.5 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ y sometidas a un campo magnético alterno durante 15 min. (a) Imagen teñida con Hoechst-33258. (b) Imagen teñida con rojo neutro. (c,d) Células apoptóticas con ambas tinciones. (e) Células control. Barra de escala: $10 \mu\text{m}$.

Posteriormente, otra de las líneas celulares del presente estudio, las células MDA-MB-231, recibieron un tratamiento similar. Estas células se incubaron con NPMs revestidas de DMSA a la concentración de $0.4 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ durante 24 h, y a continuación, se expusieron a un campo magnético alterno de 204 kHz y 396 G, durante 45 min. La morfología celular se analizó 24 h después del tratamiento combinado (NPMs DMSA + campo magnético), mediante las tinciones de rojo neutro y Hoechst-33258.

A las 24 h de finalizar el tratamiento, se observaron diferentes tipos de alteraciones morfológicas. Por una parte, células gigantes mono- o multinucleadas y/o con micronúcleos y metafases alteradas (características de la muerte celular por catástrofe mitótica), y por otro lado, células con morfología apoptótica, indicando un mecanismo de muerte celular por apoptosis.

Como en los casos anteriores, las células no incubadas con NPMs DMSA pero sometidas sólo al campo magnético, presentaban una morfología similar a los controles no tratados (imágenes no mostradas). Imágenes representativas de todas estas alteraciones se muestran en la *Figura 79*.

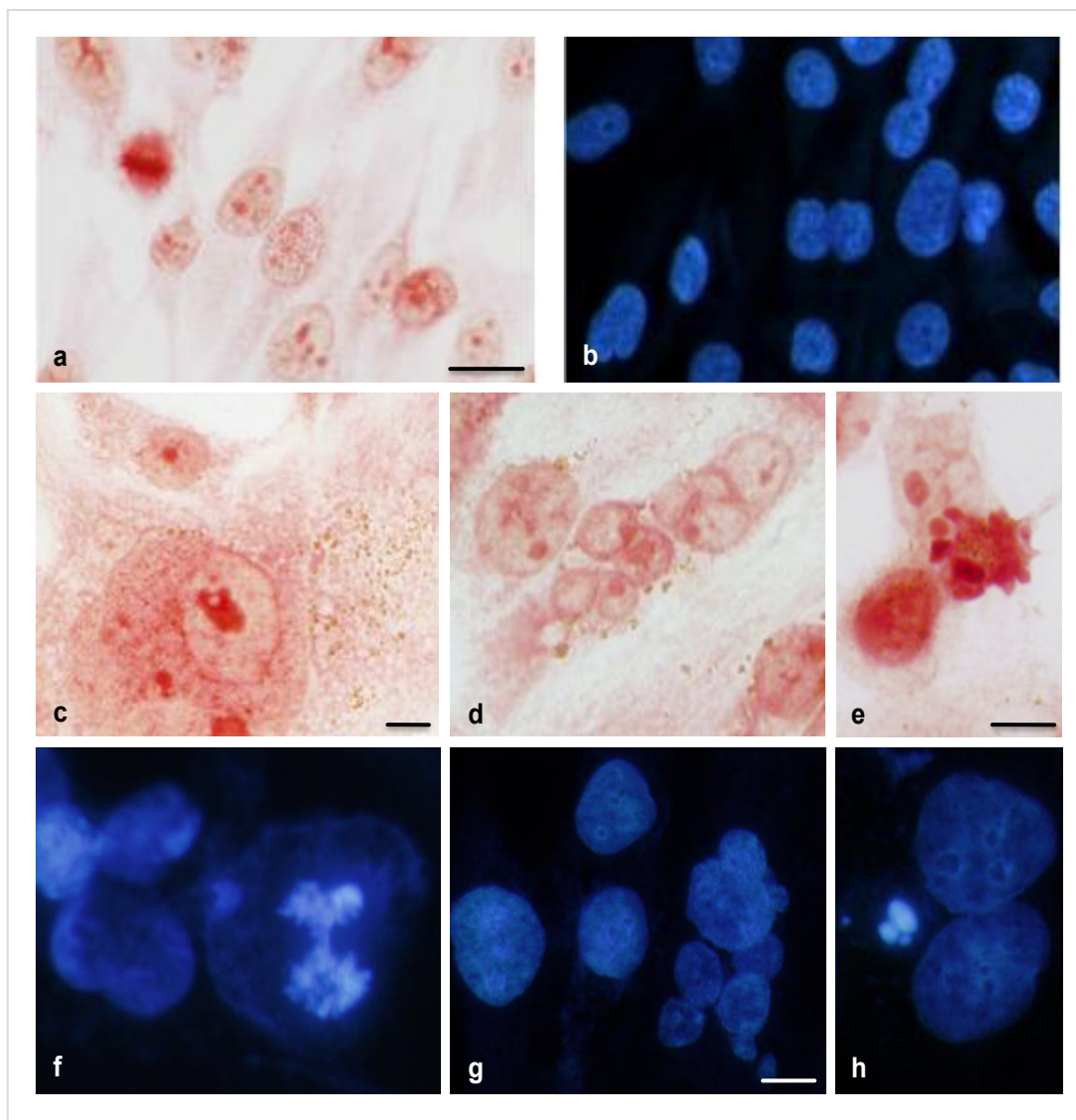


Figura 79.- Células MDA-MB-231 incubadas durante 24 h con NPs DMSA a $0.4 \text{ mg Fe mL}^{-1}$ y expuestas a un campo magnético alterno durante 45 min. (a,b) Células control teñidas con rojo neutro y Hoechst-33258, respectivamente. (c) Imagen de una célula gigante, (d,g) de células multinucleadas, (e,h) de células apoptóticas y (f) de una metafase alterada. Barra de escala: $10 \text{ }\mu\text{m}$.

2. Direccionalidad de NPMs por un campo magnético externo

El análisis de los efectos en la acumulación de NPMs en el interior celular al situar un imán debajo de la placa donde crecían las células, se realizó en células MCF-7. Las células fueron incubadas con NPMs revestidas de DMSA a una concentración de $0.05 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ durante 4 o 24 h, y además, se les colocó un imán durante ese tiempo de incubación. Pasado ese tiempo, las células fueron fotografiadas directamente bajo un microscopio óptico y teñidas con azul de Prusia. La *Figura 80 a,b* muestra como las células vivas, sin fijar, incubadas con las NPMs + el imán acumulaban mayor cantidad de nanopartículas en su citoplasma que las células sin el imán. Asimismo, las células fueron fijadas y teñidas con la tinción de azul de Prusia para corroborar los resultados comentados anteriormente (ver *Figura 80 c,d*). La cantidad de hierro acumulada era similar o superior a la cantidad acumulada cuando las células se incubaban con dichas NPMs a $0.4 \text{ mg Fe ml}^{-1}$. Resultados similares se obtuvieron cuando las células se incubaron durante 4 h (datos no mostrados).

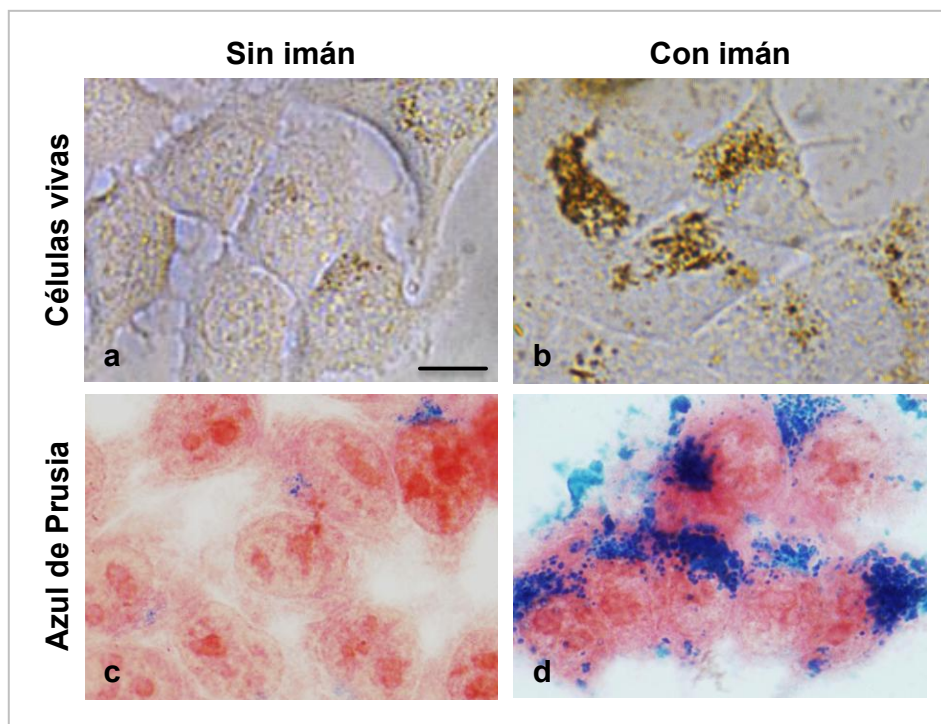
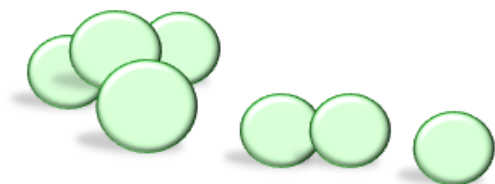
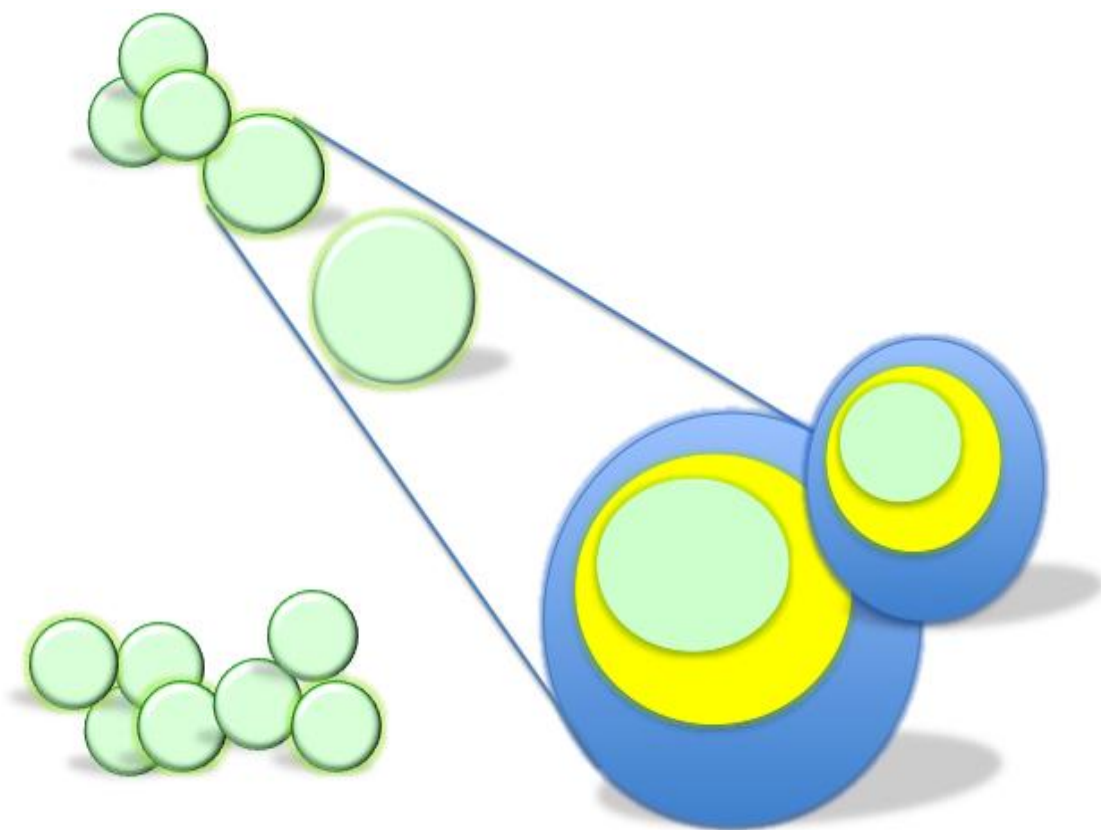


Figura 80.- Células MCF-7 incubadas con NPMs DMSA a $0.05 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ durante 24 h. (a) Células incubadas con NPMs DMSA sin imán. (b) Células incubadas con NPMs DMSA con imán, observadas directamente al microscopio óptico. (c,d) Mismas condiciones que a,b pero teñidas con azul de Prusia. Barra de escala: $10 \mu\text{m}$.



Capítulo 4: Nanopartículas magnéticas.

Agentes de contraste



Los estudios relacionados con las aplicaciones de las nanopartículas magnéticas en Biomedicina, se completaron con otros dos tipos de nanomateriales, para su posible aplicación como agentes de contraste y por lo tanto diseñadas para el diagnóstico por imágenes. La caracterización de las propiedades magnéticas de ambos materiales fue realizada por los grupos de investigación responsables de su diseño.

1. Nanorods

Una representación esquemática de la forma los nanorods donde se muestran su composición: los poros infiltrados por el agua que las rodea y los nanocristales de ferrita, se recoge en la *Figura 81 A*. Además, estos nanorods fueron caracterizados al microscopio electrónico de transmisión (ver *Figura 81 B*). En la imagen se observa la forma alargada de este tipo de nanomaterial y la uniformidad entre todas las partículas.

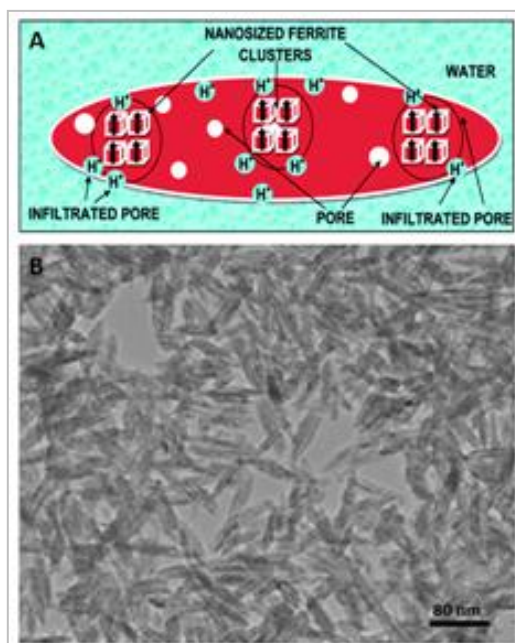


Figura 81.- (A) Representación esquemática los nanorods. (B) Imagen al TEM de la morfología de los nanorods. Barra de escala: 80 nm.

Las células HeLa tratadas con los distintos tipos de nanorods a concentraciones de 0.05, 0.1 y 0.5 mg Fe ml⁻¹ durante 24 h, fueron teñidas con la tinción del azul de Prusia para confirmar la entrada y acumulación de este tipo de nanomaterial en el citoplasma de las células. Como muestra la *Figura 82 A*, las células HeLa no incubadas con los nanorods y teñidas con azul de Prusia, resultaron negativas para esta tinción y no se observó ningún punto azul en su interior, mientras que las células incubadas con los diferentes tipos de nanorods a la mayor concentración ensayada (0.5 mg Fe ml⁻¹) presentaban puntos azules en el citoplasma que correspondían a la internalización del nanomaterial por las células. Asimismo, la viabilidad celular fue evaluada mediante el ensayo colorimétrico del MTT a las 24 h del tratamiento. Sólo se muestran la imagen de uno de los tipos de nanorods, debido a que todos los tipos son similares. Como se observa en la *Figura 82 B*, la supervivencia celular no se vio afectada cuando las células HeLa se incubaron con los diferentes tipos de nanorods a las tres concentraciones ensayadas durante 24 h (sólo se muestra los datos de la mayor concentración).

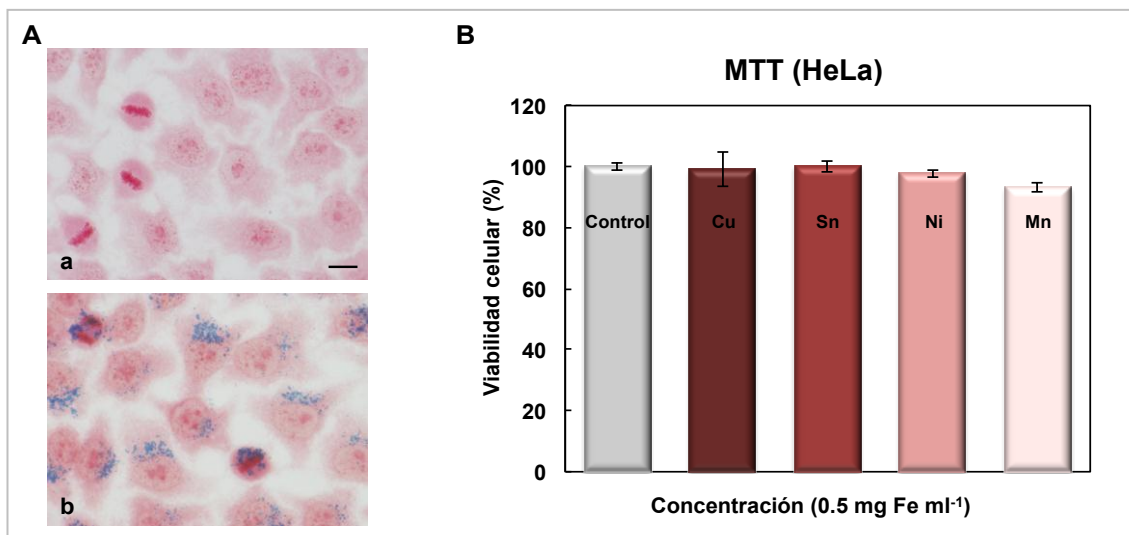


Figura 82.- (A) Células HeLa teñidas con la tinción del azul de Prusia. (a) Células control. (b) Células incubadas con Ni-nanorods a 0.5 mg Fe ml⁻¹ durante 24 h. Barra de escala: 10 μ m. (B) Evaluación de la viabilidad celular mediante el ensayo del MTT en células HeLa 24 h después del tratamiento.

2. Nanopartículas revestidas de bismuto

La caracterización de las nanopartículas magnéticas cuyo núcleo estaba formado por óxido de hierro revestido de bismuto, se realizó al MET (TEM) y mediante un estudio más específico empleando un detector de campo oscuro anular de alto ángulo (*high angle anular dark field*, HAADF). Como se observa en la *Figura 83 A a*, estas nanopartículas se caracterizaban por una elevada uniformidad en cuanto a su forma y tamaño (8 nm), y como muestra la *Figura 83 A b*, los átomos de Bi se distinguían fácilmente de los de Fe, ya que brillaban más. Estas nanopartículas fueron modificadas con silicio y PEG (FeBi@SiPEG). Posteriormente, las células HeLa fueron incubadas con las nanopartículas FeBi@SiPEG a $0.05 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ - $0.01 \text{ mg Bi ml}^{-1}$, $0.1 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ - $0.02 \text{ mg Bi ml}^{-1}$ y $0.5 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ - $0.1 \text{ mg Bi ml}^{-1}$ durante 24 y 48 h y se tiñeron con la tinción del azul de Prusia. Las nanopartículas se internalizaban y acumulaban en el interior de las células. Esta internalización dependía, como se ha comentado en el Capítulo 1, de la concentración. A las 24 h de incubación se producía una cinética de saturación, como también se comentó en el Capítulo 1, por lo que no se observó una acumulación incrementada de éstas nanopartículas en el citoplasma a las 48 h de incubación (ver *Figura 83 B*).

Para corroborar los resultados anteriores, se llevó a cabo una cuantificación del contenido de hierro intracelular, así como de los controles, mediante el ensayo colorimétrico de la ferrocina. Para ello, las células fueron incubadas con las nanopartículas a las diferentes concentraciones durante 24 h. Como muestra la *Figura 83 C*, el contenido de hierro intracelular dependía de la concentración: 3.0 ± 0.3 , 5.4 ± 0.9 , 7.8 ± 0.3 y $41.7 \pm 1.3 \text{ pg Fe cel}^{-1}$, respectivamente. Y finalmente, la viabilidad celular fue evaluada mediante el ensayo colorimétrico del MTT. Las células HeLa fueron incubadas con las nanopartículas a las distintas concentraciones durante 24 h y después de 24 h de finalizar el tratamiento se realizó el ensayo del MTT. Los resultados obtenidos indicaron que la supervivencia celular no disminuía por la incubación con las nanopartículas de FeBi@SiPEG (sólo se muestran los datos de la mayor concentración) (ver *Figura 83 D*).

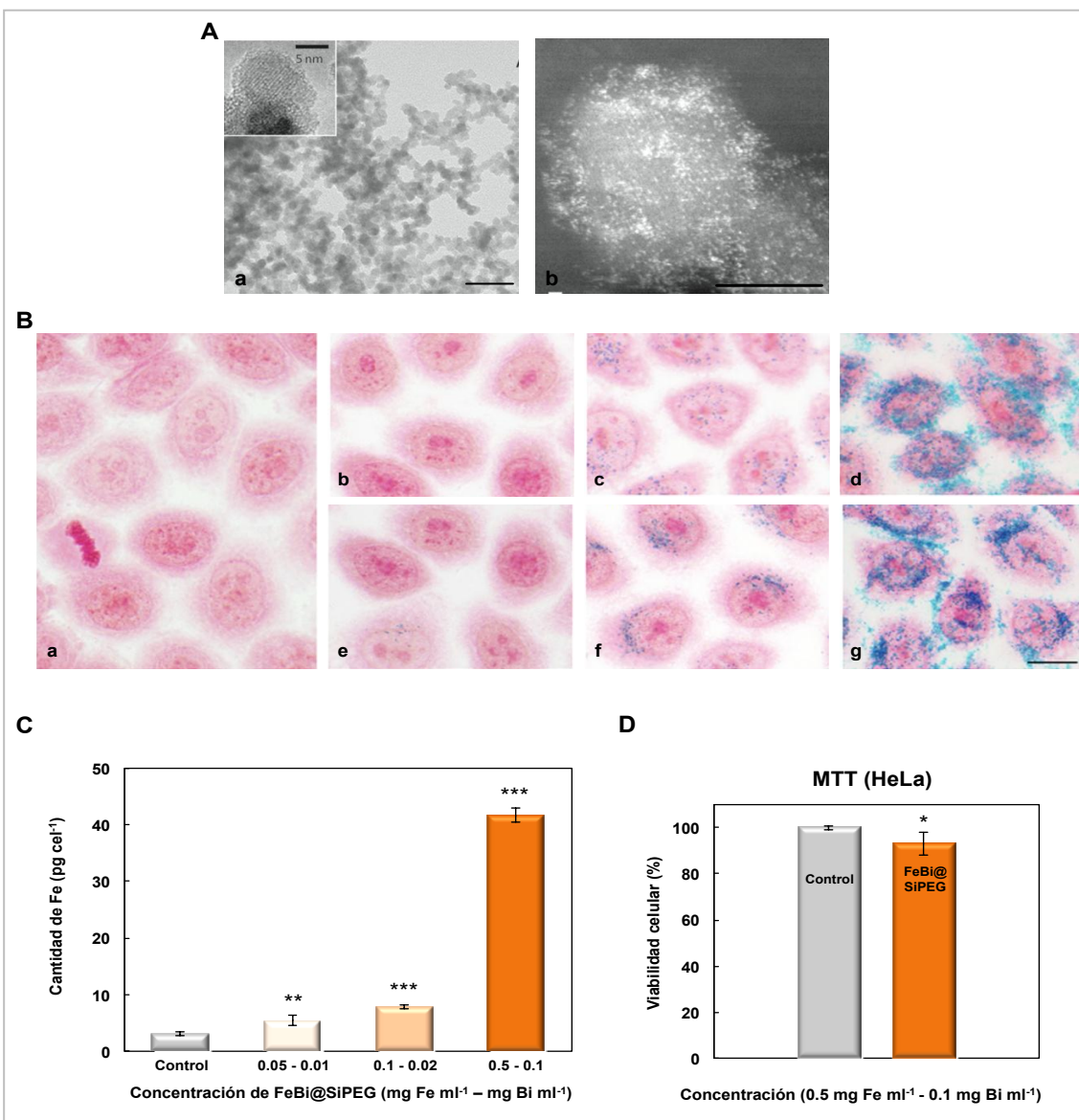


Figura 83.- (A) Imágenes representativas de las nanopartículas. (a) Observación del núcleo de FeBi al TEM. La imagen inserta en a, muestra el núcleo formado sólo por Fe. Barra de escala: 50 nm. (b) Imágenes del núcleo de FeBi utilizando la técnica HAADF. Barra de escala: 5 nm. (B) Células HeLa incubadas con FeBi@SiPEG a distintas concentraciones: (a) células control, (b) 0.05 mg Fe ml⁻¹ - 0.01 mg Bi ml⁻¹ durante 24 h, (c) 0.1 mg Fe ml⁻¹ - 0.02 mg Bi ml⁻¹, y (d) 0.5 mg Fe ml⁻¹ - 0.1 mg Bi ml⁻¹ y teñidas con azul de Prusia. (e-g) Mismas condiciones que (b-d) pero 48 h de incubación. Barra de escala: 10 µm. (C) Cuantificación del contenido de Fe intracelular mediante el ensayo de la ferrozina. Células HeLa incubadas durante 24 h con FeBi@SiPEG a 0.05 - 0.01, 0.1 - 0.02, 0.5 - 0.1 mg Fe ml⁻¹ y mg Bi ml⁻¹, respectivamente. (D) Evaluación de la viabilidad mediante el ensayo del MTT en células HeLa 24 h después del tratamiento.

En la *Figura 84* se muestran las imágenes obtenidas por tomografía computerizada (TC) y resonancia magnética (RM) adquiridas después de una inyección subcutánea de FeBi@SIPEG en la pierna izquierda de un ratón. Las imágenes de resonancia magnética presentaban un contorno difuso de la zona donde se inyectaba el contraste y era imposible la observación de las áreas circundantes. Por el contrario, la TC permitía una determinación precisa de la ubicación del contraste y su concentración (flecha roja en la imagen TC coronal) o su ausencia (si una burbuja de aire se inyecta accidentalmente) (flecha roja en la imagen CT axial). Estaba claro que las imágenes por TC en presencia de bismuto, generaban un mayor contraste que las obtenidas por resonancia magnética.

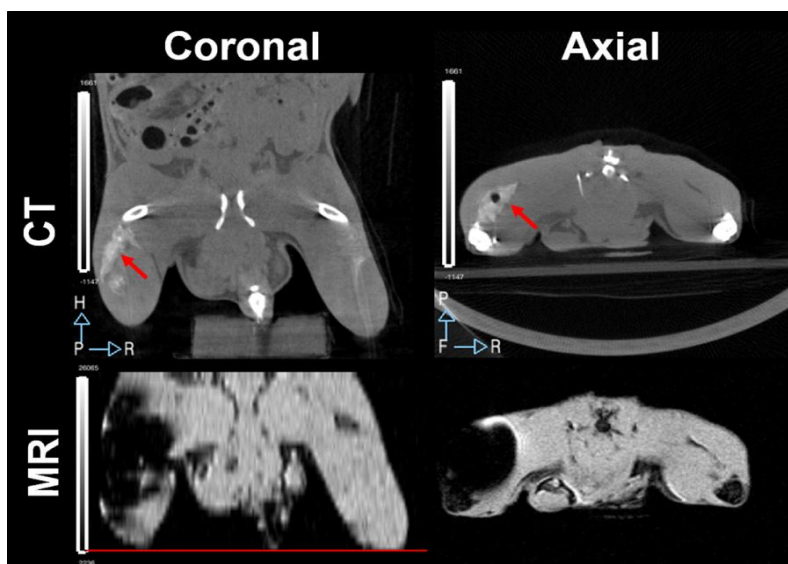
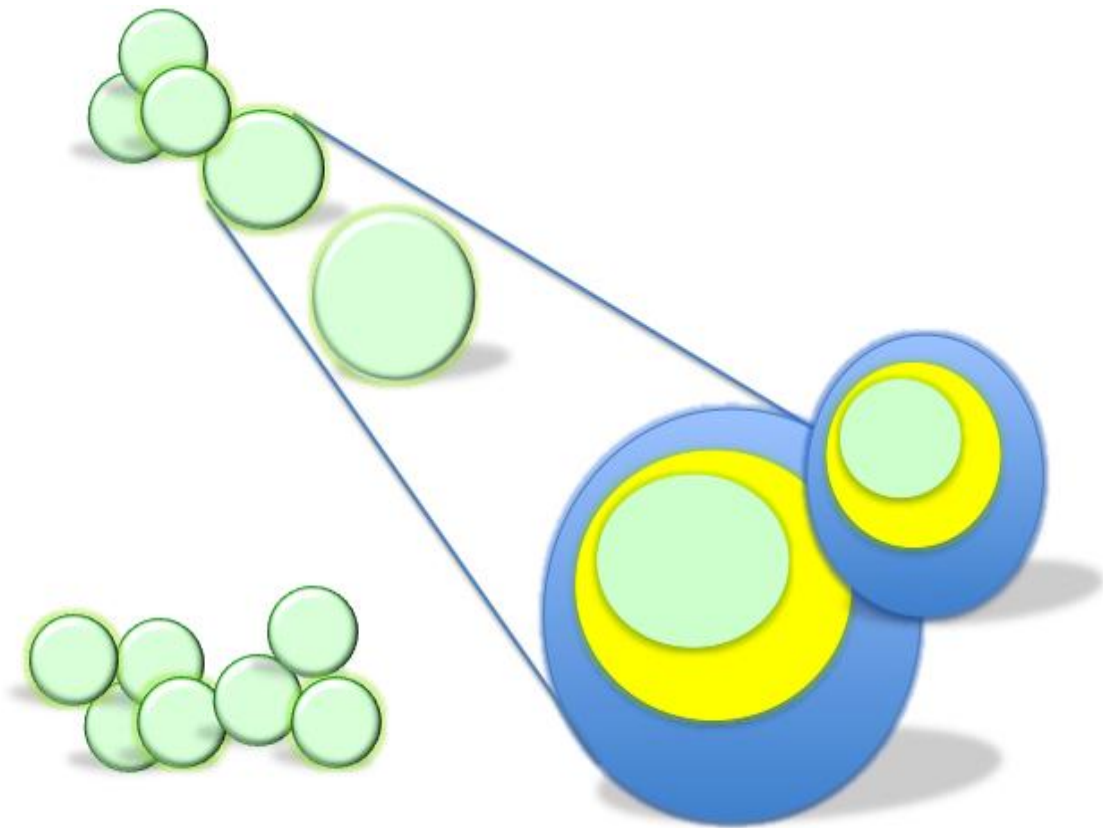


Figura 84.- Imágenes coronales y axiales tomadas por TC y la RM después de la administración subcutánea de 100 μ l de FeBi@SIPEG (157 mM de Fe y 14,6 mM de Bi). La ubicación del contraste en la pierna izquierda del ratón estaba marcada con una flecha en las imágenes de TC. El punto negro es una burbuja de aire inyectado accidentalmente.

DISCUSIÓN



En los últimos años, las nanopartículas magnéticas están experimentando un espectacular desarrollo y adquiriendo una gran importancia en el campo de la biomedicina debido a sus múltiples aplicaciones. Estas aplicaciones incluyen el uso de las nanopartículas como agentes de contraste para el diagnóstico por resonancia magnética, como mediadores para la terapia antitumoral mediante la liberación dirigida de fármacos, y la inactivación de las células tumorales mediante la hipertermia intracelular^{5,13,19,43}. Además, se están desarrollando y sintetizando nanoplateformas multifuncionales para su empleo como agentes multiterapéuticos o teragnósticos. La teragnosis es una nueva estrategia de tratamiento que combina la terapia y el diagnóstico³³.

La eficacia de estas aplicaciones terapéuticas depende en gran medida de las interacciones célula-nanopartícula y de la capacidad para acumular gran cantidad de material magnético en las células del órgano diana. Las investigaciones actuales priorizan la búsqueda de nuevos materiales y de revestimientos que faciliten su circulación por el organismo, eviten el reconocimiento por parte del sistema retículo-endotelial y permitan su eliminación del organismo una vez que hayan desempeñado su función^{1,13,19,43}.

En este sentido, el número de publicaciones relacionadas con la Nanotecnología se ha ido incrementado exponencialmente en los últimos años y numerosos nanomateriales magnéticos han sido aprobados y comercializados para su aplicación clínica⁴.

Es importante resaltar que el eje central de esta Tesis Doctoral, se ha llevado a cabo con NPMs recubiertas de DMSA, ya que fueron seleccionadas para una ambiciosa investigación de carácter multidisciplinar, que implicaba el desarrollo de una novedosa nanotecnología mínimamente invasiva, que permitiera mejorar el diagnóstico y el tratamiento del cáncer. El proyecto (Multifunctional nanotechnology for selective detection and treatment of cancer, Multifun) ha sido financiado por la Unión Europea (VII Programa Marco, contrato nº 262943) desde 2011 a 2015, y ha contado con la participación de 16 socios: Queen Mary University of London, United Kingdom; ATOS (Project Coordinator) Spain; Fundacion Centro Nacional de Investigaciones Oncologicas Carlos III Spain, Universite Paris XII-Val de Marne, France; Consejo Superior de Investigaciones Cientificas Spain; Fyzikalni Ustav AV CR V.V.I Czech Republic; Fundacion Imdea-Nanociencia (Scientific Coordinator) Spain, Institut National des Sciences Appliquees de Toulouse Insat, France; King's

College London, United Kingdom; Liquids Research LTD, United Kingdom; PEPRIC NV, Belgium; Pharmamar, S.A.U., Spain; Trinity College of Queen Elizabeth, Dublin, Ireland; University College Cork, CORK, Ireland; Universitätsklinikum Jena, Germany and The University of Manchester, United Kingdom.

Nuestra contribución al proyecto Multifun ha consistido en evaluar la eficacia de internalización (incluyendo la cinética de acumulación), la biocompatibilidad de las NPMs recubiertas de DSMA (sin funcionalizar), así como analizar los mecanismos de muerte celular inducidos por las NPMs recubiertas de DSMA funcionalizadas con DOX, tanto en cultivos de líneas celulares establecidas de mama (MCF-7, MDA-MB-231, BT-474, SK-BR-3 y MCF-10A), como en las mamoesferas formadas a partir de células MDA-MB-231.

1. Biocompatibilidad

Estudios recientes han evidenciado que algunos nanomateriales puedan resultar perjudiciales para la salud, ya que en cultivos celulares se han detectado efectos citotóxicos con nanopartículas de diversa composición, tamaño y forma. Concretamente, las nanopartículas de cobalto-plomo⁶⁴, de óxido de cobre⁶⁵ y de plata^{66,99} son claros ejemplos de ello. Por ello, se está realizando un gran esfuerzo para evaluar la toxicidad inducida por nanopartículas de distinta naturaleza en diferentes cultivos celulares utilizando diversa metodología, como los ensayos de viabilidad, detección de ROS, el análisis del ciclo celular y de la morfología celular, entre otros¹⁰⁰. Sin embargo, el principal problema que afronta este reto, es la falta de consenso entre los distintos investigadores en cuanto a la variedad de métodos, materiales y líneas celulares empleadas, lo que dificulta la comparación de los datos disponibles^{8,11,101-104}.

En base a este problema, numerosas revisiones científicas y organismos de salud han realizado un llamamiento para evaluar con unos criterios consensuados el posible riesgo del uso de dichos nanomateriales, surgiendo el término: “Nanotoxicología”, que se ha definido como *el estudio de los efectos de las nanopartículas en organismos vivos*. De hecho, en Estados Unidos se ha establecido un programa entre la Agencia de Protección Medioambiental (United States Environmental Protection Agency, EPA) y el Instituto Nacional de Seguridad y Salud Ocupacional (*The*

National Institute of Occupational Safety and Health, NIOSH), para evaluar la toxicidad de los nanomateriales que puedan afectar tanto a la salud de las personas que trabajan con ellos, como a la de futuros pacientes.

Asimismo, la mayoría de los grupos de investigación coinciden en que la causa principal del potencial citotóxico de algunos tipos de NPs es la inducción de estrés oxidativo en el interior de la célula al generarse especies reactivas de oxígeno (ROS)^{8,65,66,103,105}. Otros investigadores también han propuesto que la formación de la corona de proteínas es otra de las causas que inducen toxicidad, ya que la unión de las proteínas del suero del medio de cultivo a la superficie de las NPs, altera la composición del medio celular en el que crecen. Por ello, las NPs recubiertas inducen una menor citotoxicidad, no sólo por la biocompatibilidad de la cubierta, sino también porque disminuyen los lugares de adsorción de las proteínas, iones y otros componentes del medio⁴³.

Partiendo de estos hechos, el primer gran objetivo que se planteó en este trabajo de investigación fue analizar en profundidad, las propiedades de entrada y acumulación, así como la biocompatibilidad de distintas nanopartículas magnéticas formadas por un núcleo de óxido de hierro, pero que tenían diferentes tipos de cubierta (AD, DMSA, APS, H y D), en la línea celular tumoral HeLa (cáncer de cérvix), ya que es la línea celular más comúnmente usada por diferentes laboratorios.

Nuestros resultados evidenciaron que tres de estas nanopartículas magnéticas (AD, DMSA y APS) eran capaces de acumularse en el interior de las células, sin inducir efectos citotóxicos. Por el contrario, la viabilidad celular se veía significativamente afectada cuando las nanopartículas estaban revestidas de heparina (H) y eran internalizadas por las células HeLa, mientras que las recubiertas de dextrano (D), con carga neutra, no entraban en el interior de las células.

Los resultados obtenidos en relación al grado de internalización, mediante observación de las células en microscopía de campo claro (para evitar posibles artefactos de la fijación), demostraron que la acumulación de las nanopartículas, dependía de cuatro factores: i) el tipo de cubierta de la NPM, ii) la concentración de la NPM, iii) el tiempo de incubación de la misma, y iv) la línea celular utilizada. Las NPMs con cubierta de APS demostraron ser las más eficaces para acumularse en el citoplasma de las células HeLa, mientras que las recubiertas de AD y DMSA tenía prácticamente la

misma eficiencia de entrada y acumulación. El patrón de distribución intracelular visualizado era en forma de puntos de diferente tamaño y de color marrón/ocre distribuidos en el citoplasma de la célula, pero siempre fuera del núcleo. Es importante mencionar que hasta nuestro conocimiento, fue la primera vez que se describía una detección directa (mediante microscopía de campo claro) de NPMs de óxido de hierro en el interior de células tumorales en cultivo¹⁸. Para la mayoría de las NPs estudiadas en la actualidad resulta necesario el uso de técnicas complementarias (microscopía electrónica de transmisión o marcaje con moléculas fluorescentes) para poder visualizarlas¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.

A continuación, la tinción con azul de Prusia confirmó que la internalización de estas NPMs dependía de los cuatro parámetros que acabamos de citar. Resultados similares a los nuestros, en cuanto al grado de internalización, han sido descritos para nanopartículas recubiertas de DMSA con distinto diámetro en células Pan02 (células tumorales pancreáticas de ratón) después de 24 h de incubación⁵⁵. Asimismo, la cuantificación del hierro acumulado en el interior de las células corroboró que la cantidad de las NPMs APS en el citoplasma de las células HeLa era mayor que la de NPMs AD y DMSA, siendo muy similar en los dos últimos casos. Nuestros resultados resultan difíciles de comparar con los de otras investigaciones, debido a las diferencias en las metodologías experimentales utilizadas (tamaño y cubierta superficial de las NPs, tiempo de incubación, concentración, tipo línea celular, etc.). Sin embargo, Fan y col.¹⁰⁹ analizaron mediante este mismo ensayo la internalización de nanopartículas de óxido de hierro recubiertas de carboximetil quitosan y ácido fólico en las líneas celulares tumorales humanas, A549 (cáncer de pulmón), HeLa (cáncer de cérvix) y KB (cáncer bucal). Los autores determinaron que la acumulación dependía de dos factores: el tipo celular y la superficie externa de las NPMs. Después de 24 h de incubación con las NPMs a $0.8 \text{ mg Fe ml}^{-1}$, la cantidad de nanopartículas internalizadas en células HeLa, que expresaban niveles medios de receptores de folato, fue significativamente menor que las tres NPMs cuantificadas en nuestro estudio. De forma similar, la cantidad de NPMs recubiertas de APS acumuladas en células HeLa fue claramente mayor que las obtenidas después de 24 h de incubación con PEG-MNPs funcionalizadas con la secuencia arginina-glicina-acido aspártico-serina (RGDS) para aumentar la internalización en las células ($80 \text{ vs } 50 \text{ pg Fe cel}^{-1}$, respectivamente)¹¹⁰. En esta misma línea, Arbab y col.¹¹¹ detectaron cantidades menores de hierro en células HeLa (6 pg Fe cel^{-1}) después de 24 h de incubación con el complejo ferumóxidos-poli-L-lisina.

Los resultados obtenidos en las cuatro líneas celulares tumorales de mama (MCF-7, MDA-MB-231, BT-474 y SK-BR-3) y en la línea celular no tumoral de mama (MCF-10A), indicaron que las NPMs revestidas de DMSA, seguían el mismo patrón de distribución subcelular y que la internalización también dependía de los cuatro factores comentados anteriormente. Resultados que se confirmaron mediante la tinción con azul de Prusia¹¹². Además, mediante la cuantificación de hierro se demostró: i) que a partir de las 24 h se producía una cinética de saturación en la entrada de nanopartículas en las células, ii) que la eliminación de las nanopartículas se producía lentamente y iii) que las células MCF-7 internalizaban menor cantidad ($20.67 \text{ pg Fe cel}^{-1}$) de NPMs recubiertas de DMSA que las células HeLa ($37.1 \text{ pg Fe cel}^{-1}$) después de 24 h de incubación a la misma concentración. Esta pequeña diferencia puede deberse a la diferencia de diámetro de las NPMs de DMSA (15 vs 9 nm) y/o a la línea celular. Resultados similares en cuanto a la cinética de saturación en la entrada de NPMs han sido descritos por el grupo de Gu y col.¹¹³ en células RAW264.7 (macrófagos murinos) incubadas con NPMs revestidas de DMSA a una concentración de $0.025 \text{ mg Fe ml}^{-1}$. Los autores mostraron que esta saturación en la cinética de entrada se producía a las 12 h de incubación. Asimismo, las células RAW264.7 internalizaban mayor cantidad de NPs DMSA ($37.9 \text{ pg Fe cel}^{-1}$) después de 24 h de incubación a una concentración de $0.025 \text{ mg Fe ml}^{-1}$, que las células HeLa ($37.1 \text{ pg Fe cel}^{-1}$) o MCF-7 ($20.67 \text{ pg Fe cel}^{-1}$) utilizadas en nuestro estudio a una concentración de $0.5 \text{ mg Fe ml}^{-1}$. Los resultados no resultan sorprendentes, puesto que se trata de una línea celular especializada en la endocitosis por fagocitosis.

Para conseguir aumentar la cantidad de NPs en el interior de las células, otros grupos ha llevado a cabo incubaciones a tiempos prolongados y un incremento de la concentración¹¹⁴ o han propuesto los dendrímeros¹¹⁵ y péptidos transmembrana¹¹⁶ para este fin. Sin embargo, como se ha demostrado en nuestro estudio, se produce una cinética de saturación en la entrada de las NPs a las células. Además, la exposición a elevadas concentraciones de NPs durante tiempos muy prolongados, puede causar efectos citotóxicos^{18,112,117}.

Posteriormente, los resultados del marcaje con la sonda fluorescente LysoTracker® Red DND-99 para los compartimentos ácidos nos ha permitido identificar a los endosomas como los orgánulos subcelulares de acumulación de estas NPMs, en las líneas celulares estudiadas. Un patrón

similar de localización subcelular ha sido observado en otras líneas celulares, para nanopartículas tanto similares como de naturaleza muy diferente: en células Pan02 incubadas con NPMs revestidas de DMSA⁵⁵, en células A549 incubadas con NPMs revestidas de AD¹¹⁸ y en células HT-29 (células de cáncer de colon humanas) incubadas con NPMs revestidas de PVA¹¹⁹, debido a que el mecanismo de entrada de las NPs dentro de las células se realiza por vías endocíticas. La identificación de este mecanismo de internalización, fue confirmado mediante las pruebas de incubación que se llevaron a cabo a 4 °C. Existe numerosa literatura que describe que el mecanismo de internalización de NPs de diversa naturaleza se inhibe cuando las células están a 4 °C, lo que demuestra que es necesario un gasto de energía para que se produzca la internalización^{94,113,120,121}.

Con este tipo de ensayo, no se puede identificar la ruta endocítica exacta (fagocitosis, endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolina o macropinocitosis) por el que se internalizan las NPs, pero gracias a los estudios llevados a cabo en microscopía electrónica de transmisión, pudimos identificar la vía de entrada específica de las diferentes NPMs en las células HeLa, MCF-7 y MCF-10A. Esta ruta era la misma en las tres líneas celulares humanas y además, dependía del tamaño de los agregados. Para los agregados de < 200 nm la entrada se producía por endocitosis mediada por clatrina y para los de tamaño > 200 nm, por macropinocitosis. Una vez internalizadas las NPMs, se empaquetaban en endosomas tempranos en el citoplasma de la célula que maduraban a endosomas tardíos/lisosomas y se dispersaban por toda la célula^{112,122}.

En relación a la internalización de las NPMs en las células no tumorales MCF-10A, los resultados no fueron sorprendentes. Es bien conocido que todas las líneas celulares establecidas, incluyendo las células no malignas, poseen alteraciones en su genoma que las hacen diferentes de las células "sanas" del organismo y por lo tanto no puede ser considerada como una línea celular humana completamente "normal"^{123,124}. En este mismo sentido, se ha descrito que tanto los QD con diferentes recubrimientos superficiales, como otros tipos de nanopartículas de óxido de hierro, diferentes a las empleadas en este estudio, pueden acumularse tanto en células MCF-7 como MCF-10A^{125,126}.

En relación a los mecanismos de endocitosis, nuestros resultados son similares a los descritos por Rejman y col.¹²⁷. Estos autores mostraron que el mecanismo de internalización

dependía del tamaño de los agregados que formaban las nanopartículas. Otros estudios también han propuesto un proceso de macropinocitosis para NPMs de óxido de hierro catiónicas revestidas de AD o sin revestir en células A549 o revestidas de silicio unidas a un flourocromo en células PC3 (células tumorales de próstata humanas)^{118,128,129}.

En resumen, hemos confirmado que la entrada y acumulación de las NPMs en las células depende de los cuatro factores citados anteriormente y de múltiples características fisicoquímicas, tales como el tamaño, la forma, la carga superficial y el tipo de revestimiento. Además, muchos de esos parámetros pueden ser modulados durante el proceso de síntesis y producción de las NPs. En este sentido, las características físico-químicas de las nanopartículas están enfocadas a cómo afectan a los procesos de su interacción biológica^{8,130}.

Se sabe que la membrana plasmática posee gran cantidad de dominios cargados negativamente, por lo que no resulta sorprendente que se produzca una menor internalización de NPs con carga superficial negativa. Se ha descrito que la entrada de NPs con recubierta catiónica está favorecida respecto a las aniónicas, por la carga neta negativa de la membrana plasmática²⁷. Nuestros resultados se encuentran en esa línea y han mostrado que las nanopartículas cargadas positivamente (APS) eran capaces de entrar y acumularse con mayor eficacia que las cargadas negativamente (DMSA) en el interior de las células HeLa. Además, la internalización de las NPs APS se producía sin inducir ningún tipo de alteración en la membrana plasmática, ya que el mecanismo de entrada se producía por endocitosis, después de que las NPs se adherían a la membrana plasmática⁹⁴. Este hecho, de que una gran cantidad de NPs AD, DMSA o APS sean capaces de adherirse a la membrana plasmática antes de internalizarse en las células, fue comprobado con los resultados que obtuvimos al microscopio electrónico de barrido⁸. De acuerdo a estos resultados, Kenzaoui y col.¹¹⁹ demostraron que las nanopartículas de óxido de hierro recubiertas de polivinilamino, cargadas positivamente, se acumulaban con mayor eficacia que las nanopartículas recubiertas de ácido oleico, cargadas negativamente, en dos líneas celulares de cáncer de colon humanas (HT-29 y Caco-2). Además, consideramos que nuestros resultados aportan una nueva información en relación a la discrepancia que existe sobre el mecanismo de entrada de NPs cargadas positivamente en el interior de las células. En este sentido, el grupo de Leroueil y col.¹³¹

demonstró que NPs catiónicas inorgánicas, como las NPs de oro (Au-NH₂) u óxido de silicio aminadas (SiO₂-NH₂) fueron capaces de inducir lesiones en la membrana plasmática debido a que formaban perforaciones en dicha membrana.

En relación a los componentes del citoesqueleto, concretamente a los microtúbulos, hemos comprobado que la acumulación de NPMs del tipo AD, DMSA y APS en el interior de las células HeLa no afectaba la distribución ni organización de los MTs, incluyendo los del huso mitótico. Sin embargo, las NPMs recubiertas de heparina a la mayor concentración ensayada (0.5 mg Fe ml⁻¹), inducían un bloqueo de las células en metafase, por lo que se duplicaba el índice mitótico respecto a los controles. Además, se comprobó que este aumento se debía a la presencia de metafases alteradas, multipolares o bien con los cromosomas mal alineados, lo que explicaba el descenso en la viabilidad detectado en los ensayos de citotoxicidad. Hasta nuestro conocimiento, fue la primera vez que se describía un bloqueo metafásico para cualquier tipo de nanopartícula analizada. Sin embargo, es bien conocido que existen numerosas drogas, como el etopósido o el docetaxel (no relacionadas con las NPs), que son capaces de inducir una parada del ciclo en metafase y una posterior muerte celular por apoptosis en células HeLa, MCF-7 o MDA-MB-231^{132,133}.

Del mismo modo, las NPMs DMSA a la mayor concentración estudiada (0.4 mg Fe ml⁻¹) y después de 72 h de incubación tampoco indujeron ninguna alteración en los MTs interfásicos ni del huso de las células MCF-7, MDA-MB-231 ni BT-474, en las cuales fueron analizados. En esta misma línea, el grupo de investigación de Gupta y col.¹³⁴ también mostró que la internalización de NPs recubiertas de polietilenglicol no afectaba a la distribución y ni a la organización de los MTs de los fibroblastos en cultivo después de 24 h de tratamiento a una concentración de 0.1 mg Fe ml⁻¹. Sin embargo, se ha descrito que algunos tipos de nanopartículas de óxido de hierro con diferentes tamaño y recubrimiento, pueden inducir una redistribución de los MTs en las células HMVEC (células endoteliales microvasculares humanas) cuando son incubadas durante 30 min a una concentración de 0.05 mg Fe ml⁻¹³⁵. Asimismo, las investigaciones llevadas a cabo por Wu y col.¹³⁶ también mostraron cambios en la red de MTs de las células HUVEC (células endoteliales de la vena umbilical) cuando se incubaron con NPs de óxido de hierro revestidas de dextrano o ácido cítrico durante 1 h. Estos investigadores describieron que tras la incubación con las NPs revestidas de dextrano, se

producía una interrupción en las estructuras de los MTs en el dominio central y periférico, mientras que con las revestidas de citrato se visualizaba un marcaje difuso de la tubulina y el eje mayor de los MTs era más corto de lo normal, lo que sugiere una interferencia con la polimerización y despolimerización de los mismos.

Los estudios llevados a cabo con el otro componente del citoesqueleto, los filamentos de actina, y de la proteína vinculina con las NPMs revestidas de AD, DMSA y APS en células HeLa, y las NPMs recubiertas de DMSA en las líneas celulares tumorales humanas MCF-7, MDA-MB-231 y BT-474 indicaron que, a pesar de la gran cantidad de NPMs acumuladas en el citoplasma de las células, la distribución de las fibras de estrés o de la actina cortical, ni el patrón de distribución de la vinculina, proteína que forma parte de las adhesiones focales, no se veían afectados. Resultados similares han sido descritos por el grupo de Gupta *y col.*¹³⁴, analizando los filamentos de actina, en fibroblastos en cultivo, después de 24 h de incubación con NPs recubiertas de polietilenglicol. Sin embargo, el grupo de Soenen *y col.*¹³⁷ detectó que las nanopartículas de carboxidextrano (Resovist®) y los magnetoliposomas a concentraciones de $0.1 \text{ mg Fe ml}^{-1}$ durante 24 h de tratamiento, afectaban a la morfología celular y a la actina-F que forman las fibras de estrés. Asimismo, el grupo de Wu *y col.*¹³⁶ también ha descrito alteraciones de los filamentos de actina en las células HUVEC (células endoteliales de la vena umbilical) cuando se incubaban con NPMs de óxido de hierro revestidas de dextrano o ácido cítrico durante 1 h. Cuando las células se trataban con las NPs revestidas de dextrano, éstas presentaban una morfología redondeada y los filamentos de actina eran más delgados y estaban menos organizados, mientras que cuando se trataban con las NPs revestidas de ácido cítrico las células contenían vacuolas dentro del citoplasma y un marcaje de la vinculina muy débil en los contactos focales, lo que inducía una reducción de las fibras de estrés y de la actina cortical.

En este sentido, nuestros resultados relacionados con la ausencia de alteraciones en la adhesión celular y en ambos componentes del citoesqueleto podrían explicarse por el uso de diferentes tipos de recubrimiento de las NPMs. Es importante mencionar que el citoesqueleto de actina une a las células adyacentes y a las células con la matriz extracelular, jugando un papel crítico en la organización y mantenimiento de estas estructuras, y regula la permeabilidad epitelial¹³⁸.

Recientemente, se ha descrito que los MTs también son importantes para la unión y estabilidad de las células adyacentes, así como en la regulación de la permeabilidad paracelular¹³⁹.

En relación a los estudios relacionados con el ciclo celular, Mahmoudi y col.¹⁴⁰ han realizado una detallada revisión de los efectos de nanopartículas de naturaleza muy distinta (orgánicas e inorgánicas) en el ciclo celular de diferentes líneas celulares. En ella, se recoge que las NPMs de óxido de hierro (sin cubierta o revestidas de alcohol polivinílico o carboxi-dextrano), producen diversas alteraciones en el ciclo celular. Sin embargo, en dicha revisión no estaban incluidas las NPMs de óxido de hierro con las cubiertas empleadas en el presente estudio.

Nuestros resultados evidenciaron que las células HeLa no presentaban alteraciones en la distribución de las distintas fases del ciclo después de la incubación con las nanopartículas magnéticas AD, DMSA y APS, ni las células MCF-7, MDA-MB-231, BT-474 y SK-BR-3 después de ser incubadas con las NPMs DMSA. Sin embargo, Xia y col.¹⁴¹ mostraron que las nanopartículas de maghemita revestidas de DMSA a las que se les había unido a su superficie derivados de protamina inducían un bloqueo del ciclo celular en la fase S en hepatocitos humanos.

Por otra parte, está aumentando el número de estudios *in vitro* e *in vivo* que demuestran que algunos nanomateriales, pueden inducir alteraciones en el equilibrio redox e inducción de estrés oxidativo, responsables, por lo tanto, de la inducción de nanotoxicidad. En la revisión de Manke y col.¹⁴², se señala como la nanotecnología ha ofrecido descubrimientos innovadores en los sectores médico, industrial y de consumo, pero no están exentos de preocupaciones por la exposición ambiental y ocupacional.

Los cambios en las propiedades estructurales y fisicoquímicas de NPs pueden conducir a cambios en las actividades biológicas, incluyendo la generación de ROS. El estrés oxidativo inducido por se debe a factores no celulares, tal como la superficie de las partículas, tamaño, composición, y la presencia de metales, mientras que las respuestas celulares, tales como la respiración mitocondrial, la interacción NP-célula, y la activación de células del sistema inmune, son responsables de los daños mediados por ROS. Dado que el estrés oxidativo es un factor determinante de los daños inducidos por las NPs, es necesario evaluar la generación de ROS que resulte de la exposición a las NPs.

Los efectos prooxidantes directos de las NPs son atribuibles a sus propiedades físico-químicas, incluyendo reactividad superficial, tamaño de las partículas, carga de superficie, composición química, y la presencia de metales de transición. Teniendo en cuenta su reactividad química, las NPs basadas en metales pueden inducir daño oxidativo a macromoléculas celulares, tales como proteínas, lípidos y ADN, a través de las reacciones tipo Fenton y Haber. Los resultados fisiopatológicos de daños oxidativos durante las exposiciones a las NPs, implican lesiones en la membrana de las células, desnaturalización de las proteínas, y la alteración de la homeostasis del calcio, que pueden conducir a la activación de factores de transcripción, la liberación de mediadores de citocinas, y la apoptosis. El desequilibrio redox a través de las NPs, puede ejercer resultados fisiopatológicos indeseables, tales como: genotoxicidad, inflamación, fibrosis, y carcinogénesis. Por lo tanto, resulta de suma importancia comprobar el potencial oxidativo de las NPs diseñadas, antes de su comercialización.

En este sentido, hemos realizado un estudio de la posible inducción de ROS en las células incubadas con las NPMs estudiadas. Nuestros resultados han demostrado que no se producían alteraciones en la morfología nuclear, ni se detectó la presencia de micronúcleos que podrían indicar posibles daños genotóxicos por la incubación con los diferentes tipos de NPMs. Sin embargo, en otros estudios llevados a cabo con NPMs, se observó que se acumulaban en el citoplasma sin entrar en el núcleo, pero la mayoría sí que causaban citotoxicidad al inducir daño genotóxico por el incremento de las ROS^{100,128,143,144}. Hay que señalar que estas NPMs tenían diferente tamaño, cubierta y fueron incubadas a distinta concentración y en otras líneas celulares que las empleadas en nuestro estudio. Por ejemplo, se realizaron en células Calu-3 (células tumorales de pulmón humana) incubadas con NPs de silicio a 0.05 mg Fe ml⁻¹ durante 24 h, en células A549 tratadas con diferentes fracciones de magnetita durante 24 h y en células PC12 (célula de la médula adrenal de rata) incubadas con NPMs a 0.05 mg Fe ml⁻¹ durante 24 h.

Otros autores han detectado que en las células incubadas con NPs de óxido de hierro, también se inducía un daño genotóxico, por un aumento de radicales OH[•] generados por las reacciones Fenton en la mitocondria de la célula y que luego eran difundidos al citosol¹⁴⁵. Nuestros

resultados han indicado que la sensibilidad al estrés oxidativo -mediado por ROS- dependía de la línea celular, siendo más sensible las células HeLa⁸ que las MCF-7¹¹² o que las MDA-MB-231.

Además, las células (HeLa, MCF-7, MDA-MB-231, BT-474 y MCF-10A) que se tiñeron con rojo neutro y Hoechst-33258, no mostraron ninguna de las alteraciones morfológicas que caracterizan el desencadenamiento de un proceso autofágico o apoptótico, después de la administración de las nanopartículas. Sin embargo, se ha descrito que las NPMs de óxido de hierro recubiertas de dextrano y de ácido cítrico, son capaces de inducir una muerte celular por apoptosis en células HUVEC después de 1 h de incubación¹³⁶. Asimismo, las NPs de óxido de hierro incubadas en células A549 después de 48 h de tratamiento indujeron muerte celular por autofagia, correlacionado con la generación de ROS y un daño mitocondrial¹⁴⁶. Por todo ello, se ha propuesto que las alteraciones en la morfología celular tiene una fuerte correlación con el grado de citotoxicidad de las nanopartículas^{147,148}.

Continuando con el análisis de la toxicidad, uno de los ensayos mediante el cual se evaluó la citotoxicidad de las NPMs en el presente estudio, fue el ensayo colorimétrico del MTT. Se demostró que las NPMs revestidas de AD, DMSA, APS y D resultaban biocompatibles en células HeLa ya que la supervivencia celular no se veía afectaba por la entrada y acumulación de las NPMs en el interior de las células. Únicamente, las muestras recubiertas de heparina a la mayor concentración ensayada ($0.5 \text{ mg Fe ml}^{-1}$) ejercían un efecto tóxico y reducían la viabilidad celular un 25%. Del mismo modo, las NPs DMSA no inducían citotoxicidad en ninguna de las líneas celulares de cáncer de mama utilizadas, a la mayor concentración ensayada ($0.4 \text{ mg Fe ml}^{-1}$). Es importante resaltar que el ensayo colorimétrico del MTT¹⁴⁹ y el protocolo de 24 h de incubación con las NPs¹⁵⁰, son considerados como el test y el diseño experimental -respectivamente- más adecuados para analizar el efecto citotóxico de este tipo de nanomaterial.

En este sentido, Lanone y col.¹⁵⁰ realizaron un estudio de toxicidad con 24 tipos distintos de nanopartículas, entre las que no se encontraban las de óxido de hierro. Sus resultados demostraron que las nanopartículas de zinc y cobre, resultaron ser las más tóxicas cuando se incubaban a distintas concentraciones (de 0.0001 a 10 mg ml^{-1}) durante 24 h en células THP-1 (monocitos humanos). Sin embargo, como resultado de otras investigaciones, se han propuesto tiempos de post-incubación más largos (hasta 72 h) para evaluar la biocompatibilidad de las NPMs modificadas con dendrímeros

de poliamidoamina en células MCF-7, MDA-MB-435 (cáncer de mama humanas) y HepG2 (tumores de hígado humanas)¹¹⁵. En nuestros ensayos relativos a 72 h de incubación tampoco se detectó citotoxicidad inducida por las NPs⁸.

Por otro lado, el ensayo del MTT ha sido parcialmente cuestionado en base a que algunos tipos de NPMs podrían afectar al funcionamiento normal mitocondrial⁶⁹ produciéndose un incremento en la generación de ROS¹⁵¹, que podrían conducir a un daño celular y muerte. Debido a ello, también utilizamos el test de exclusión del azul Tripán para comparar la biocompatibilidad de las NPMs con el ensayo colorimétrico del MTT. Los resultados obtenidos con el azul Tripán, indicaron que la supervivencia fue > 90% con todas las NPMs ensayadas en las diferentes líneas celulares (HeLa, MCF-7 y MDA-MB-231). Es importante resaltar que este ensayo ha sido propuesto por el grupo de Hoskins *y col.*¹⁵² como el principal método estándar para validar la viabilidad celular después de la incubación con NPMs. Este grupo evaluó la viabilidad de las NPMs revestidas de polietilenoimina (NPs-PEI) y polietilenglicol (NPs-PEI-PEG) en células H-SY5Y (células de neuroblastoma humano) y RAW264.7 mediante tres tipos de ensayos: i) MTS (colorimétrico), ii) CellTiter-Blue (fluorescente) y iii) CellTiter-Glo (luminiscente), y a continuación, los datos fueron corroborados con el test tradicional del azul Tripán. Las concentraciones ensayadas fueron de 0.00156 a 0.025 mg Fe ml⁻¹ y el tiempo de incubación 24 h.

Numerosas investigaciones han evidenciado que la concentración de las NPs, ejerce un papel fundamental en los efectos citotóxicos inducidos por algunos tipos de NPs^{18,150}.

Hay que tener en cuenta que la concentración más elevada que hemos empleado en nuestras investigaciones, ha sido de 0.5 mg Fe ml⁻¹. Esta concentración es igual o superior a las utilizadas en otros estudios. Por ejemplo, células J774 (macrófagos murinos) fueron tratadas con NPMs revestidas de Tween 80 a concentraciones de 0.025 hasta 0.5 mg Fe ml⁻¹¹¹⁷; para las células HEK293 (células embrionarias humanas de riñón) se utilizaron NPMs a concentraciones de 0.02 hasta 0.1 mg Fe ml⁻¹¹¹³; los fibroblastos humanos tratados con NPMs revestidas con Dextrano a 0.05 mg Fe ml⁻¹ o células endoteliales incubadas con NPMs sin recubrimiento a 0.09 mg Fe ml⁻¹ o células de melanoma humano tratadas con NPMs recubiertas de PVA a concentraciones de 0.012 hasta 0.123 mg Fe ml⁻¹. Estos tres últimos estudios están recogidos en la revisión de Mahmoudi *y col.*¹⁴⁹. Sin

embargo, en otras investigaciones se ha utilizado concentraciones muy superiores a $0.5 \text{ mg Fe ml}^{-1}$, como también se recoge en la revisión de Mahmoudi y col.¹⁴⁹.

Por todo lo que se acaba de comentar en relación a la citotoxicidad de los nanomateriales, todos nuestros resultados justifican el estudio exhaustivo que debe llevarse a cabo de la caracterización biológica de las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro. Un abordaje multi-paramétrico del análisis de la biocompatibilidad, como el realizado en nuestras investigaciones, incluyendo además de los ensayos clásicos de citotoxicidad, la evaluación de la morfología celular, la detección de ROS, el análisis del ciclo celular, así como el análisis de los componentes del citoesqueleto, resultan imprescindibles para poder confirmar que las NPMs AD, DMSA y APS, son además de eficientes, seguras en posibles aplicaciones biomédicas^{147,149}. Este es un factor crucial antes de la funcionalización de estas NPMs para dichas aplicaciones (imágenes de resonancia magnética, liberación controlada de fármacos y/o hipertermia intracelular), ya que se requiere un elevado nivel de acumulación intracelular para que el tratamiento sea eficaz.

En resumen, en esta primera parte de nuestro estudio hemos analizado las dos propiedades generales que debe reunir una NP, antes de su evaluación en animales de experimentación¹⁴⁵, y por lo tanto, para su aplicación en biomedicina: i) alta eficacia de acumulación dentro de las distintas células tumorales (para que puedan ejercer su función) y ii) ausencia de toxicidad en cultivos celulares (para evaluar los posibles efectos tóxicos en células sanas del organismo, si no se produjera una acumulación selectiva en el tumor).

Con esta perspectiva, estos primeros estudios resultaban fundamentales para el posterior desarrollo de NPMs funcionalizadas con moléculas, ya que una vez que se internalizan en las células, las NPMs pueden ser procesadas y separarse en sus distintos componentes (núcleo y recubrimiento).

2. Agentes transportadores de fármacos

Una vez comprobada la biocompatibilidad de las NPs DMSA, se procedió a analizar su eficacia como sistemas para el transporte de fármacos antitumorales. En el presente estudio se ha

evaluado la eficacia de transporte de las nanopartículas recubiertas de DMSA a las que se les ha unido covalentemente la doxorubicina (DOX) empleando tres enlaces diferentes.

La doxorubicina es un antibiótico de antraciclina que se utiliza comúnmente en la quimioterapia de una gran variedad de formas de cáncer. Se trata de un potente agente intercalante que bloquea la síntesis y transcripción del ADN e inhibe la actividad de la enzima topoisomerasa II, implicada en la replicación del material genético, y que aparece sobreexpresada en células con alta tasa de proliferación, como las células tumorales²⁶. Por ello, es fundamental que la DOX sea capaz de alcanzar el núcleo celular, donde ejerce su acción citotóxica. Sin embargo, las células tumorales también sobreexpresan transportadores del tipo ABC en la membrana plasmática, implicadas en la expulsión al medio extracelular de una amplia variedad de fármacos quimioterapéuticos hidrofóbicos, como es el caso de la DOX^{58,154}. Asimismo, uno de los mayores retos de la quimioterapia es la búsqueda de mecanismos que permitan evadir esta resistencia a los fármacos antineoplásicos (*Multiple Drug Resistance*, MDR)¹⁵⁵. Como se recoge en la revisión de Kapse-Mistry y col.⁵⁸ existen varias estrategias para superar la MDR en las células tumorales, una de ellas es utilizar diferentes tipos de nanomateriales como sistema para el transporte y liberación de fármacos en la terapia del cáncer. Entre esos nanomateriales se encuentran las NPMs. De este modo, evaluaríamos la eficacia de las nanopartículas magnéticas empleadas en este estudio como agentes transportadores de fármacos y como mecanismo para reducir la resistencia a la quimioterapia por parte de las células tumorales. También es importante mencionar que la DOX induce alteraciones en el ciclo celular dependiendo de la concentración y del tiempo de incubación ensayado.

Los resultados obtenidos en este estudio han indicado que las NPMs que llevan unida covalentemente DOX, son capaces de entrar y acumularse eficazmente en las células tumorales MDA-MB-231. Además, se ha comprobado que parte de la DOX (molécula con propiedades fluorescentes) era capaz de liberarse de las NPMs a las que iba unida y de alcanzar el núcleo de las células. Si bien, la liberación de la DOX de las NPMs y la detección de sus efectos citotóxicos, requerían intervalos de tiempos relativamente prolongados después de finalizar el tratamiento. Concretamente, cuando las nanopartículas recubiertas de DMSA llevaban incorporada la DOX con los

tres tipos de enlaces (MNP-O-DOX, MNP-M-DOX y MNP-I-DOX), los efectos relativos a la inactivación celular se detectaron a las 72 h después del período de post-incubación.

Resultados en la misma dirección a los obtenidos en nuestras investigaciones, han sido descritos previamente, en otras líneas celulares. Por ejemplo, en células C6 (células de glioma de rata) expuestas durante 4 h a DOX unida covalentemente a NPMs recubiertas de PEG, se detectaba una baja fluorescencia roja (debida a la DOX) en el núcleo celular, pero elevada en determinadas zonas del citoplasma y unidas a las NPMs a las 20 h del tratamiento¹⁵⁶. Resultados similares se obtuvieron en células MCF-7 tratadas durante 3 h^{157,158}. Los autores proponen que la cubierta de PEG protege a la DOX de las enzimas que induce su liberación de las NPMs, por lo que la señal de fluorescencia se asigna a las NPMs y no a la liberación del fármaco¹⁵⁹. Del mismo modo, Bagherifam y col.¹⁶⁰ observaron una baja emisión roja de la DOX en el núcleo pero alta en el citoplasma y unidas a las nanopartículas, en células MDA-MB-231 tratadas con nanocápsulas que contenían la DOX después de 24 h de incubación y analizadas a las 72 h de post-incubación. Estos autores proponen que pueden actuar dos posibles mecanismos: i) concentraciones pequeñas pero suficientemente tóxicas de DOX, se intercalarían en el ADN para producir muerte celular sin permitir su localización nuclear en microscopía de fluorescencia; y ii) la DOX se podría liberar en el citoplasma e inducir la muerte celular por la lisis de los lisosomas^{161,162}. Por otra parte, Zeybek y col.¹⁶³ han descrito que unas nanoesferas magnéticas con albúmina ($0.001 \text{ mg Fe ml}^{-1}$) que llevaban unida la DOX, se acumulaban en diferentes orgánulos subcelulares. Concretamente, después de 2 h de incubación se localizaron en la membrana celular y no llegaban al núcleo de las células A549, mientras que estas mismas nanoesferas alcanzaban el núcleo de las células PC3.

Por otra parte, en nuestras investigaciones detectamos alteraciones morfológicas observadas mediante la tinción con azul de Prusia, la inmunofluorescencia de α -tubulina y el marcaje de actina-F, que indicaban de una forma indirecta, que parte de la DOX era liberada de las NPMs, y era capaz de alcanzar el núcleo de las células, donde ejercía su acción citotóxica sobre el ADN. El resultado fue la detección de una elevada proporción de células de gran tamaño (gigantes), multinucleadas y con micronúcleos. Además, en muchas de ellas, se mantenían puentes de cromatina internucleares. Todas estas características son propias de un tipo de muerte celular

denominado: catástrofe mitótica¹⁶⁴. Estas alteraciones se pudieron observar, sobre todo, con los enlaces MNP-O-DOX y MNP-M-DOX. Concretamente, con el enlace MNP-M-DOX también se pudo observar un bloqueo de las células en metafase, lo que se traducía en un incremento del índice mitótico, que se duplicaba respecto al control. Sin embargo, con el enlace MNP-I-DOX la cantidad de células con morfología redondeada y encogida cuya cromatina estaba condensada y fragmentada fue más elevada que con los dos enlaces comentados anteriormente. Estas son las características propias de una muerte celular por apoptosis¹⁶⁵. Asimismo, estas células no mostraban una disposición radial de los MTs ni una organización de la actina-F formando fibras de estrés, por lo que ambos componentes del citoesqueleto, estaban desorganizados. Las pocas células que sobrevivían eran, en su mayoría, células de gran tamaño mononucleadas y expresaban ambos componentes del citoesqueleto.

En base a estos resultados, se puede concluir que la DOX desencadenaba la muerte de las células MDA-MB-231 por un mecanismo de catástrofe mitótica (mayoritario) y por apoptosis (en menor proporción), a las 72 h de post-incubación cuando va unida covalentemente a las NPs con los enlaces MNP-O-DOX, MNP-M-DOX y MNP-I-DOX. Sin embargo, una mayor proporción de células apoptóticas fue observada usando el enlace MNP-I-DOX. Estos resultados no son totalmente sorprendentes teniendo en cuenta que existen numerosas investigaciones que han evidenciado que la DOX es capaz de inducir muerte celular por catástrofe mitótica en distintos tipos de líneas tumorales establecidas, Huh-7 (células humanas de un tumor hepático), HCT-116 (células humanas de cáncer de colon), MDA-MB-231, entre otras^{166,167}. La catástrofe mitótica se ha descrito como una forma de muerte celular que ocurre durante o después de mitosis alteradas^{77,168,169} aunque para algunos investigadores, no se considera una forma de muerte celular, sino más bien una forma irreversible de desencadenar la muerte celular. Los marcadores morfológicos de la catástrofe mitótica pueden proceder u ocurrir en paralelo con la senescencia celular (un bloqueo en la fase G₂ del ciclo celular, una actividad incrementada de la β -galactosidasa y un descenso en la función telomerasa)⁷⁷. Además, la muerte por catástrofe mitótica puede culminar presentando características propias de la apoptosis, incluyendo la activación de las caspasas.

En concordancia con nuestros resultados, las NPMs revestidas de DMSA combinadas con concentraciones no tóxicas de bortezomib (BTZ) y ácido gambógico (GA), 0.0025 y 0.2 μM , respectivamente, indujeron un bloqueo del ciclo celular en la fase G_2 a las 48 h de incubación, en células RPMI-8226 (células de melanoma) y posteriormente, se desencadenaba la muerte celular por apoptosis mediante la activación de la caspasa 3¹⁷⁰. Asimismo, nuestros resultados también están en total concordancia con los publicados por Eom y col.¹⁶⁶ y Portugal y col.¹⁶⁷. Estos autores han demostrado que la DOX es capaz de inducir dos mecanismos distintos de muerte celular: apoptosis y catástrofe mitótica (acompañada por un fenotipo del tipo senescencia), en función de la concentración utilizada. Conviene también destacar la coincidencia de los resultados de dicha publicación con los obtenidos en la presente investigación en relación a los siguientes parámetros: i) la muerte celular por catástrofe mitótica es inducida con mayor retraso que la apoptosis, ii) las células que sufren la muerte por catástrofe mitótica se convierten en multinucleadas y aumentan de tamaño, mientras que las células apoptóticas se encogen y, iii) el contenido de ADN en las células que experimentan muerte celular a través de la catástrofe mitótica son heterogéneamente hiperploides, mientras que las células apoptóticas son en su mayoría subdiploides.

Asimismo, la adquisición de imágenes de las células a tiempos prolongados después de la incubación con las NPMs que contenían DOX, indicaron que las células entraban en un estado de senescencia, no detectándose ningún incremento en la densidad celular de los cultivos que se mantenían en el incubador. Este mismo efecto a largo plazo también ha sido descrito para dosis bajas de DOX¹⁶⁶. Existe muy poca literatura acerca del estado senescente de las células. Concretamente, la organización de los componentes del citoesqueleto (microtúbulos y filamentos de actina) en células senescentes, está muy poco investigado. Nuestros resultados confirman que en las células en senescencia que continúan adheridas al sustrato, las fibras de estrés no tenían una morfología alterada y los microtúbulos presentaban una organización normal. Por el contrario, las células con una morfología apoptótica perdían la adhesión al sustrato, en su mayoría, y los filamentos de actina y los microtúbulos estaban desorganizados.

Posteriormente, los datos de viabilidad obtenidos mediante el ensayo colorimétrico del MTT corroboraron los resultados anteriores. Los mayores efectos citotóxicos se obtuvieron con el enlace

MNP-I-DOX (60% de muerte celular) y los menores efectos con el enlace MNP-O-DOX (20% de mortalidad). Los resultados de viabilidad celular empleando MNP-I-DOX mediante el ensayo del azul Tripán son algo menores (80% de muerte celular) a los obtenidos con el MTT. Esta discrepancia podría deberse a los distintos protocolos de manipulación celular, utilizados en dichos experimentos.

Si comparamos las tres formulaciones ensayadas, resultaba mucho más eficaz la del enlace MNP-I-DOX, ya que se obtuvo una mayor reducción de la viabilidad celular. Hay que tener en cuenta que este enlace es sensible a ambientes reductores y pH ácidos, por lo que, la mayor la liberación de la DOX se producía cuando las NPs se localizan en los endosomas tardíos/lisosomas. Es bien conocido que estos orgánulos tienen un pH entre 4 y 5, suficientemente ácido para que se produzca la liberación de las DOX¹⁵⁶. Valores de viabilidad de un 50% han sido descritos por el grupo de Gautier y col.¹⁵⁸ en células MCF-7 tratadas con DOX-PEG-MNP a 1 μ M, pero durante 96 h de incubación. Sin embargo, la viabilidad de las células MCF-7 tratadas con DOX unida a nanopartículas magnéticas mesoporosas a una concentración de 2 μ M fue mayor (60%) a la obtenida en nuestro estudio (40%), pero a concentraciones muy superiores (10 μ M) a las usadas en nuestro trabajo, la viabilidad celular fue bastante similar (35%) después de 24 de incubación¹⁷¹. Otros autores han descrito que la viabilidad de las células HeLa se redujo alrededor de un 90% (10% de células viables) cuando se trataron con nanopartículas magnéticas de óxido de hierro que llevaban unidad DOX a una concentración de 20 μ M después de 48 y 72 h de incubación, pero sólo se redujo un 40% (60% de células viables) cuando las concentraciones fueron de 2 y 10 μ M. Además, el método usado por este grupo para evaluar la viabilidad fue el ensayo CellTiter-Glo Luminescent¹⁷². Asimismo, el grupo de Tomankova y col.¹⁷³ detectó una viabilidad del 80% en células MCF-7 tratadas con DOX unida a nanoclusters superparamagnéticos de óxido de hierro durante 24 h a una concentración de DOX de 0.5 o 5 μ M usando el ensayo colorimétrico del MTT. En resumen, nuestras NPMs unidas a la DOX de forma covalente han demostrado ser nanoplataformas muy eficaces, ya que utilizando bajas concentraciones de doxorubicina, la viabilidad celular se ve reducida en mayor medida, si la comparamos con los estudios realizados por otros grupos.

En relación a las investigaciones biomédicas, el cultivo tradicional *in vitro* de células tumorales en monocapa (cultivos bidimensionales, 2D), ha brindado una enorme gama de resultados

con respecto al comportamiento y respuesta celular a diversos agentes terapéuticos. Sin embargo, dichos resultados son muchas veces contradictorios cuando se escalan a nivel clínico. A diferencia de los tumores, los cultivos en monocapa son esencialmente homogéneos en cuanto al estado nutricional, la presión de oxígeno, el estado proliferativo, el pH y la eliminación de productos de desecho¹⁷⁴. La estructura tridimensional nativa de los carcinomas gobierna numerosas interacciones autocrinas y paracrinas relacionadas con la progresión del tumor. Estas interacciones no pueden ser recreadas en el modelo de cultivo en monocapa (2D) ya que los contactos célula-célula están disminuidos y pierden la heterogeneidad asociada en un tumor sólido. Este problema se ha resuelto, en parte, con el uso de nuevos modelos en cultivo que asemejan la intrincada y compleja red tridimensional de las células en un organismo. Estos cultivos, denominados esferoides tumorales multicelulares, presentan una complejidad de organización intermedia entre los cultivos bidimensionales (2D) *in vitro* y los tumores sólidos *in vivo*.

Actualmente, se están realizando cultivos tridimensionales de células madre de tejidos adultos, sanos y tumorales, ya que las células madres tienen una mayor capacidad para formar esferoides que una célula normal debido a que se mantienen en constante proliferación. Además, se están desarrollando sistemas tridimensionales de cultivo de células epiteliales mamarias humanas, que se han denominado con el término "mamoesferas"¹⁷⁵. Las células dentro de la mamoesfera son clonales, ya que provendrían de una sola célula madre pluripotente.

En este trabajo se han realizados cultivos de mamoesferas con células MDA-MB-231 tratadas con NPMs unidas covalentemente a la DOX empleando el enlace MNPs-I-DOX, que era el que había resultado ser más eficaz en lo cultivos 2D de células MDA-MB-231. Los resultados del ensayo de las mamoesferas mostraron que la mayoría de las células que sobrevivían, es decir, las células quimio-resistentes, eran células madre tumorales ya que eran las únicas capaces de formar una mamoesfera. Al mayor tiempo de post-incubación ensayado (72 h) hubo una reducción pequeña, pero significativa, de la actividad de estas células madres tumorales en relación al control. Estos resultados indicaron que esta estrategia era capaz de inactivar a las CMTs, uno de los mayores retos de la actualidad. En concordancia con nuestros resultados, el grupo de investigación de Sun y col.¹⁷⁶ ha mostrado que la DOX unida a nanopartículas de oro vía PEG y un enlace de hidracina es una

potente estrategia para la liberación de DOX, capaz de inducir la muerte de las CMTs de mama, lo cual redujo la capacidad para formar mamoesferas en células MDA-MB-231 hasta un 40%. También se han descrito estudios de mamoesferas en la línea celular tumoral MCF-7 tratadas con estrógeno y tamoxifeno. Hay que mencionar que, el receptor de estrógeno pertenece a la familia de receptores de esteroides y hormonas nucleares que son factores de transcripción que se unen al ADN y regulan la transcripción de genes diana en respuesta a la unión del ligando, mientras que el tamoxifeno es un antagonista del receptor de estrógeno (se usa ampliamente como terapia hormonal en el tratamiento de cáncer de mama con receptor de estrógeno positivo, aunque la resistencia al tamoxifeno se desarrolla con elevada frecuencia). En este estudio, el estrógeno redujo la frecuencia de formación de mamoesferas hasta seis veces, en relación a los cultivos control, mientras que un incremento, pequeño pero significativo, en el número de mamoesferas fue inducido por el tamoxifeno¹⁷⁷.

En relación a los estudios morfológicos de las mamoesferas, sólo se llevaron a cabo en las células que fueron tratadas con las MNP-I-DOX, por su eficacia para transportar y liberar la DOX. Los resultados obtenidos mostraron que el tamaño de las mamoesferas era menor que las mamoesferas del control y las tratadas con NPMs sin DOX. Además, después de realizar los protocolos correspondientes (inclusión de las mamoesferas en parafina y los sucesivos pasos), pudimos analizar la morfología de las secciones de mamoesferas, mediante tinciones (H-E y azul de Prusia) e inmunofluorescencias para α -tubulina, citocromo C y caspasa-3 activa. Las tinciones con H-E y azul de Prusia mostraron que las células de las mamoesferas tratadas con MNP-I-DOX tenían un tamaño mayor que las del control y que las tratadas con MNPs, y algunas tenían una morfología alterada. El inmunomarcaje para tubulina reveló que las células tratadas con MNP-I-DOX carecían de MTs o los tenían desorganizados, mientras que el inmunomarcaje para citocromo C y caspasa-3 activa, mostró que en las células de la mamoesfera tratadas con MNP-I-DOX, se había desencadenado la muerte celular por apoptosis ya que se había producido una relocalización del citocromo C desde la mitocondria al citosol de la célula y eran positivas para la caspasa-3 activada. Además, los núcleos de esas células estaban condensados y fragmentados. A día de hoy y hasta donde llega nuestro conocimiento, sería la primera vez que se ha llevado a cabo un estudio de este tipo en secciones de mamoesferas tratadas con doxorubicina.

Este mismo ensayo también se realizó en una muestra clínica extraída de una paciente con un adenocarcinoma de mama. Se usaron las células BB3RC79 que presentaban el mismo perfil génico que la línea celular establecida MDA-MB-231 (ER-, PR-, HER2-). En este caso sólo se evaluaron a las 24 h del tratamiento y ya se detectó una reducción significativa del número de mamoesferas en las tratadas con MNP-I-DOX con respecto al control y NPMs sin DOX, evidenciando que se estaba reduciendo la actividad de las CMTs.

En una línea similar a los ensayos de las mamoesferas, se han llevado a cabo estudios con esferoides en células MDA-MB-231, pero utilizando diferentes tipos de fármacos antitumorales. En las investigaciones llevadas a cabo por Charoen y *col.*¹⁷⁸ se emplearon NPs que llevaban unida paclitaxel (0.1 y 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Después de 24 h de incubación en las células, se observó una disminución significativa en el tamaño de esferoides, tanto a bajas como altas concentraciones. Asimismo, se demostró que el fármaco encapsulado entraba en las células vía macropinocitosis. El grupo de Dolfini y *col.*¹⁷⁹ ha utilizado como fármaco el resveratrol (un flavonoide con propiedades antioxidantes) a una concentración de 64 μM . Después de 9 días de incubación en cultivos en monocapa, las células formaron un menor número de esferoides. Posteriormente, el análisis llevado a cabo en microscopía electrónica de barrido, mostró la presencia de “burbujas” (blebs) en las células, reflejando probablemente la muerte celular por apoptosis.

En relación a las estrategias para dirigir las nanopartículas magnéticas que llevan el fármaco antitumoral hacia los órganos, los tejidos o las células diana, se han propuesto principalmente dos: i) el empleo de imanes; y ii) la funcionalización de la superficie de las NPMs con ligandos, como péptidos, anticuerpos o oligonucleótidos, entre otros, que sólo sean reconocidos por las células diana. Existe bibliografía que recoge la funcionalización de NPMs con diferentes ligandos para dirigir éstas al tumor y que se produzca allí la liberación del fármaco. Por ejemplo en una investigación (en la que participó nuestro grupo) llevada a cabo por Kossatz y *col.*⁴⁵, se emplearon NPMs revestidas de DMSA a las que se le unió electrostáticamente la doxorubicina y el seudopéptido multivalente Nucant. Estas NPMs fueron inyectadas intratumoralmente en los ratones transplantados con células MDA-MB-231. Se demostró una liberación incrementada de la DOX en las células cancerígenas gracias a la funcionalización con el seudopéptido Nucant y posteriormente, se les aplicó un campo

magnético alterno. Los resultados obtenidos indicaron que los efectos terapéuticos podían reforzarse al combinar NPMs funcionalizadas (con el pseudopéptido Nucant y la DOX) y la hipertermia magnética.

Otros grupos de investigación han empleado anticuerpos para funcionalizar las NPMs. Las NPMs revestidas de quitosán fueron funcionalizadas con PEG y modificadas o no modificadas con el anticuerpo OX26 cuyo receptor está en el cerebro (Cs-PEG-OX26 NPs o Cs NPs). Estas NPMs se administraron intraperitonealmente en ratones para definir su capacidad de llegar hasta el cerebro. Como resultado se obtuvo que las Cs-PEG-OX26 se acumulaban en mayor cantidad en el cerebro que las NPMs no modificadas, debido a: i) que podían circular durante un largo período de tiempo por el torrente sanguíneo (gracias al PEG), ii) la interacción entre las cargas positivas del quitosán y las cargas negativas del endotelio del cerebro, y iii) la afinidad del anticuerpo OX26 por su receptor¹⁸⁰.

3. Hipertermia

La hipertermia con nanopartículas magnéticas es una terapia oncológica basada en el calentamiento de los tumores mediante dichas nanopartículas incorporadas al tejido, que absorben energía de un campo magnético alterno externo. La eficiencia de calentamiento de las NPMs es calculada mediante el rango de absorción específico que depende del tamaño de las partículas, y de la frecuencia y la amplitud del campo magnético alterno¹⁸¹. Este calentamiento puede provocar necrosis (termoablación magnética) o inducir apoptosis selectiva de las células tumorales (hipertermia intracelular o magnética).

En cuanto al tratamiento del cáncer mediante hipertermia, existen varios métodos para aumentar la temperatura, que se clasifican según la técnica empleada: i) la hipertermia por radiofrecuencia, utiliza las corrientes eléctricas inducidas por ondas electromagnéticas que llega a unas antenas colocadas, mediante cirugía, junto a los tumores, y así, concentrar en éstos el calor; ii) la hipertermia por ultrasonidos, el calentamiento se efectúa mediante vibraciones; iii) la hipertermia por láser, que emplea nanopartículas de oro o de plata que se sitúan en los tumores y se excitan mediante un láser de infrarrojos; y iv) la hipertermia magnética, que superó en 2011 la segunda fase

de los ensayos clínicos en el glioblastoma (tumor cerebral) y ya se está utilizando junto a la radioterapia convencional para tratar las células cancerígenas¹⁸¹.

En relación a nuestros resultados obtenidos en los ensayos por calentamiento (baño térmico a 44 °C) en distintos tipos celulares (HeLa, MCF-7, MDA-MB-231 y BT-474), para simular lo que ocurriría cuando se aplicase un campo magnético alterno, pudimos comprobar que las células tenían diferente sensibilidad a la temperatura, siendo las más sensibles las células BT-474 y las menos sensibles las células HeLa. En todos los casos, la mayoría de las células morían por desencadenamiento de la apoptosis, tal y como indicaban: el redondeamiento de las células, la pérdida de adhesión al sustrato, la condensación y fragmentación de la cromatina y la relocalización de Bax desde el citosol hacia la membrana mitocondrial externa¹⁸². Estos resultados pueden resultar relevantes para determinar cuál es el umbral necesario para inducir muerte celular en cada línea celular cuando se aplique un campo magnético alterno externo, ya que hemos observado que cada línea celular presentaba una sensibilidad diferente al incremento de la temperatura.

En experimentos similares a los nuestros, se llevó a cabo un calentamiento en un baño a tres temperaturas diferentes: 45, 47 y 50 °C durante 30 min en dos líneas celulares MCF-7 y L929. La viabilidad de estas líneas se analizó mediante el ensayo colorimétrico del MTT 24 h después del tratamiento, obteniéndose los siguientes resultados: a 45 °C la supervivencia fue del 41.3% y 57.3% para MCF-7 y L929, respectivamente, a 47 °C fue del 37.8% y 46.8% para MCF-7 y L929, respectivamente, y a 50 °C fue del 17.7% y 30.0% para MCF-7 y L929, respectivamente¹⁸³. Esto indica que las células MCF-7 son más sensibles a la temperatura que las L929. Estos resultados están en concordancia con los nuestros ya que obtuvimos una viabilidad del 60% en células MCF-7 cuando se incubaron a 44 °C durante 1 h. Asimismo, el grupo de Burke y *col.*¹⁸⁴ también calentó en un baño térmico a CMTs de mama HMLER y a las células tumorales HMLER a diferentes temperaturas (43, 45, 47 y 49 °C) durante diferentes intervalos de tiempo (10, 15, 30 y 60 min) y mostraron que: i) a medida que aumenta la temperatura y el tiempo de incubación, menor era la viabilidad celular, y ii) las CMTs fueron significativamente más resistentes a los efectos de la hipertermia que las células de cáncer de mama en todo el rango de temperaturas. Se sabe que los mecanismos de termorresistencia son multifactoriales. Sin embargo, en varios tipos celulares, la sobreexpresión de

los miembros de la familia de proteínas de choque térmico parece estar implicada en la resistencia a los tratamientos basados en el calentamiento.

Posteriormente, una vez analizada la biocompatibilidad de las NPMs revestidas de AD y DMSA, también evaluamos su eficacia para aumentar la temperatura en las células que contenían dichas NPMs, cuando se aplicó un campo magnético alterno externo (hipertermia intracelular). Las células HeLa incubadas con nanopartículas recubiertas de AD y DMSA o las células MDA-MB-231 tratadas con las NPs DMSA, fueron expuestas a campos magnéticos alternos de distinta intensidad, produciéndose una elevación de la temperatura en el interior de las células capaz de inactivarlas por apoptosis. En concordancia con nuestros resultados, el grupo de Marcos-Campos *y col.*¹⁸⁵ ha detectado una reducción de la viabilidad celular en células dendríticas incubadas con NPMs recubiertas de carboxildextrano y sometidas a un campo magnético. Las imágenes fueron evaluadas en microscopía electrónica de transmisión, observándose una muerte celular por apoptosis. La cantidad intracelular de nanopartículas detectada fue de 50 pg Fe cel⁻¹. Además, otros estudios llevados a cabo por el mismo grupo de investigación utilizando las mismas células dendríticas y las mismas NPMs, pero un menor tiempo de exposición al campo magnético alterno y con distinta cantidad intracelular de NPs (20 y 50 pg Fe cel⁻¹), mostraron valores similares de viabilidad celular, evaluado mediante el ensayo del azul Tripán¹⁸⁶. Posteriormente, mostraron que la muerte celular observada después de la exposición a un campo magnético alterno, en células dendríticas en cultivo incubadas con MNPs, estaba causada por la liberación de agentes tóxicos en los sobrenadantes del medio de cultivo de las células y no debido a un aumento de temperatura macroscópico. Este hecho fue confirmado cuando dicho sobrenadante se incubó en células controles y condujo a la muerte celular de casi todo el cultivo¹⁸⁷.

Por otra parte, se han realizado estudios *in vitro* empleado una terapia combinada con la hipertermia. El grupo de Bolfarini *y col.*¹⁸⁸ llevó a cabo una terapia combinando hipertermia y terapia fotodinámica en células pigmentadas B16-F10 (células de melanoma) utilizando magnetoliposomas, liposomas con NPMs catiónicas encapsuladas y el fotosensibilizador ftalocianina de zinc, conocida como ZnPc. Las células fueron incubadas a 0.25 µg ml⁻¹ durante 3 h, a continuación fueron irradiadas usando un láser diodo Eagle a 670 nm, una potencia de 600 mW y una luz de irradiación a 84 mW cm⁻².

², y posteriormente se les aplicó un campo magnético alterno de 1 Mkz durante 3 min. 24 h después del tratamiento combinado se evaluó la viabilidad celular y se obtuvo un 13% de células viables, mientras que la viabilidad celular de los tratamientos por separado fue del 64.8% cuando se trataban las células con terapia fotodinámica y del 76.5% cuando se les aplicaba un campo magnético alterno. De modo que la aplicación del tratamiento combinado resultaba mucho más eficaz que los tratamientos individuales, ya que la reducción de la viabilidad celular fue mayor.

En otro estudio realizado en células HeLa se empleó una terapia combinada mediante hipertermia y quimioterapia usando magnetoliposomas termosensibles (liposomas con NPMs encapsuladas) unidos a paclitaxel. Las células fueron incubadas con los magnetoliposomas unidos al fármaco y sin fármaco durante 24 h y a continuación se aplicó un campo magnético alterno externo de 423 kHz. La supervivencia celular del tratamiento con hipertermia fue del 60%, mientras que con el tratamiento combinado de hipertermia y quimioterapia sólo sobrevivía un 11%¹⁸⁹. Estos resultados de supervivencia celular obtenidos mediante el tratamiento de hipertermia, están en concordancia con los datos de nuestro estudio (70% de viabilidad celular). La pequeña diferencia se puede deber al tipo de NPM utilizada ya que ellos utilizaron magnetoliposomas (liposomas que contienen las NPMs) y nosotros NPMs.

En relación con la hipertermia, se ha descrito que una elevación de la temperatura a 43 °C induce la expresión de miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2, concretamente de Bax y Bak, produciéndose una liberación del citocromo C desde el espacio intermembrana al citosol^{182,190}, y que la hipertermia induce muerte celular al dañar irreversiblemente las diferentes estructuras celulares, como la membrana celular y el citoesqueleto de tubulina y actina, y causa daños a los complejos de enzimas requeridos para la síntesis y reparación del ADN, por lo que conduce a las células a la apoptosis.

Además de los ensayos *in vitro*, se han realizado ensayos *in vivo* donde se han sometido a tratamientos combinados de hipertermia y NPMs que funcionalizadas electrostáticamente con el pseudopéptido Nucant y DOX, comentados anteriormente⁴⁵. Un estudio similar fue realizado por el grupo de Shatale y col.¹⁹¹ pero en un modelo de fibrosarcoma (células WEHI-164) y usando NPMs funcionalizadas con ácido oleico. El tratamiento de hipertermia llevado a cabo indujo una reducción

del tamaño tumoral. Los resultados mostraron una elevada muerte celular por apoptosis y una reducida proliferación de las células tumorales. Además, los niveles de expresión de la proteína de choque térmico Hs90, disminuían.

Por último, también se ha estudiado el efecto de la aplicación de un campo magnético alterno y del calentamiento en un baño térmico en las CMTs de mama, en concreto en las células MDA-MB-231. La investigación realizada por el grupo de Sadhukha y col.¹⁹² ha mostrado que tanto las células control como las sometidas a un calentamiento en baño térmico (46 °C durante 30 min) formaron un número de similar esferas, mientras que las tratadas mediante hipertermia formaron un menor número. Después de la aplicación de un campo magnético alterno, la formación de mamoesferas se vio reducida en un 63% y 90%, respectivamente, y no se detectó ninguna mamoesfera después de 30 min del tratamiento. En este intervalo de tiempo, la muerte celular fue del 90% y los niveles de ROS aumentaron. Sin embargo, las células que sólo fueron calentadas en un baño térmico, la muerte celular fue de un 10% y los niveles de ROS generados fueron similares a los de las células control.

Por otra parte, también utilizamos un imán como estrategia para dirigir las nanopartículas en cultivos *in vitro*. Las células MCF-7 incubadas con NPs revestidas de DMSA tratadas con el imán acumulaban una mayor cantidad de nanopartículas en el citoplasma, que las células incubas con las NPMs, pero sin el imán. Nuestros resultados están en corcordancia con los estudios, tanto *in vitro* como *in vivo* recogidos en la revisión de Estelrich y col.¹⁹. A continuación se citan algunos de los estudios *in vitro* realizados utilizando imanes: i) células de adenocarcinoma de mama incubadas con NPMs a 0.32 mg Fe ml⁻¹ durante 24 h y con un imán durante ese tiempo. Después de la incubación, se midió la cantidad de hierro en células control (incubadas con NPMs pero sin imán) y en las células tratadas con un imán. Los resultados mostraron que la acumulación de MNPs fue más elevada dentro de las células tumorales que habían crecido bajo los efectos de un imán que en las células control. ii) Células CT-26 (células de cáncer colorectal) tratadas con magnetoliposomas que llevaban unida DOX y con un imán para que se acumulasen en mayor medida en las células tumorales. A continuación, se les aplicó un campo magnético alterno, por lo que se combinaba quimioterapia e hipertermia. iii) Células HeLa incubadas con un sistema compuesto por QD, nanotubos de carbono y magnetita, junto

con el fármaco DOX. Los resultados mostraron que este sistema fue capaz de transportar DOX por medio de un campo magnético externo.

4. Agentes de contraste

Los materiales de contraste, también llamados agentes de contraste, son usados para mejorar las imágenes del interior del cuerpo producidas por rayos X, tomografía axial computarizada (TAC), resonancia magnética nuclear, y ultrasonido. Los materiales de contraste permiten al radiólogo distinguir mejor las condiciones normales de las anormales.

En este trabajo hemos empleado dos tipos de nanomateriales que podrían ser usados como agentes de contraste. Concretamente, los resultados obtenidos con las nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético fuertemente confinadas e incrustadas en nanorods de óxido de hierro porosos, indicaron que este diseño arquitectónico mostraba valores de relaxividad altos y momentos magnéticos adecuados para mejorar las capacidades como agente de contraste y obtener mejores imágenes por resonancia magnética³⁶. Asimismo, las nanopartículas de óxido de hierro recubiertas de bismuto modificadas con silicio y PEG también mostraron ser buenos candidatos como agentes de contraste para el diagnóstico de patologías. En este caso, las imágenes por tomografía computarizada en presencia de bismuto, generaban un mayor contraste que las obtenidas por resonancia magnética. Teniendo en cuenta que muchas aplicaciones terapéuticas de las nanopartículas magnéticas implican la administración de los materiales a base de óxido de hierro para liberar fármacos o realizar hipertermia, resulta obvio que una forma sencilla y generalizada de controlar el proceso de acumulación así como sus efectos, sería usando la tomografía computarizada con estas nanopartículas³⁷. En esta misma línea, el grupo de Burtea y col.³⁸ ha propuesto nanopartículas de óxido de hierro revestidas de: i) dextrano y unidas a estreptavidina o biotina, ii) bifosfanato y modificadas con los péptidos E3, R826 y R832, NSP, y iii) almidón, como agentes de contraste. Los resultados obtenidos *in vitro* así parecen confirmarlo.

En resumen, el presente trabajo de investigación ha tenido como objetivo analizar en profundidad las interacciones que se establecen entre distintos tipos de NPMs de magnetita (con diferentes cubiertas y por lo tanto con distintas propiedades físico-químicas) con diferentes células

tumorales en cultivo, para seleccionar las NPMs con las características más adecuadas para su aplicación médica (ver *Figura 85*). En este sentido, hemos comprobado que cualquier nanopartícula debe cumplir dos requisitos: eficacia de acumulación intracelular y biocompatibilidad. Además, consideramos que nuestros resultados pueden ayudar a esclarecer la controversia que existe entre el tipo de carga (positiva o negativa) de las NPMs y su biocompatibilidad. Después de analizar la capacidad de acumulación y la biocompatibilidad *in vitro* de estos cinco tipos de nanopartículas magnéticas, los resultados obtenidos, indican que las NPMs DMSA pueden ser consideradas como muy adecuadas para la incorporación de fármacos antitumorales. Los resultados con la inmovilización covalente de la doxorrubicina usando el enlace sensible a pH ácido y ambiente reductor, pueden considerarse un punto de partida muy prometedor para estas NPMs, como una nueva estrategia terapéutica, ya que: i) se podrían reducir las dosis de los fármacos antineoplásicos (y en consecuencia los efectos secundarios) que reciben los pacientes, ii) se podría eludir la quimiorresistencia a los fármacos que desarrollan las células tumorales, y iii) se podrían llegar a eliminar las células madre tumorales y por lo tanto las recidivas de la enfermedad neoplásica.

Además, estas NPMs recubiertas de DMSA y de AD también son adecuadas para aplicar la hipertermia intracelular, debido a su capacidad para acumularse eficazmente en las células tumorales y calentarse en las células tumorales cuando se aplica un campo magnético alterno externo. Por lo tanto, se abren nuevas opciones terapéuticas, al permitir el uso de terapias combinadas (simultáneas o sucesivas) de fármacos anti-tumorales e hipertermia, incorporados en la misma nanoplataforma, lo que también permitiría seguir la evolución de la respuesta tumoral al tratamiento, al poderse detectar por resonancia magnética.

Por otro lado, las nanopartículas de óxido de hierro recubiertas de bismuto (FeBi@SiPEG) junto con los nanorods, podrían utilizarse como agentes de contraste para el diagnóstico mediante la tomografía computerizada o la resonancia magnética, respectivamente, debido a que mejoran el contraste entre los tejidos normales y los alterados.

Resumiendo, las nanopartículas magnéticas pueden tener distintas aplicaciones médicas en función de sus propiedades físico-químicas y biológicas. En el siguiente esquema se recogen las que consideramos más adecuadas para los nanomateriales analizados en el presente estudio.

En este sentido, los cultivos celulares son una herramienta de primera línea para que se ensaye la eficacia terapéutica y la seguridad de los medicamentos nanotransportados, y proporcionan una información esencial para la comprensión de las interacciones célula-nanopartículas, antes de pasar a los análisis *in vivo*. Por lo tanto, cualquier formulación nueva de nanopartículas magnéticas con potenciales aplicaciones biomédicas, debe ir acompañada de un estudio detallado en cultivos celulares, que garantice su eficacia y biocompatibilidad.

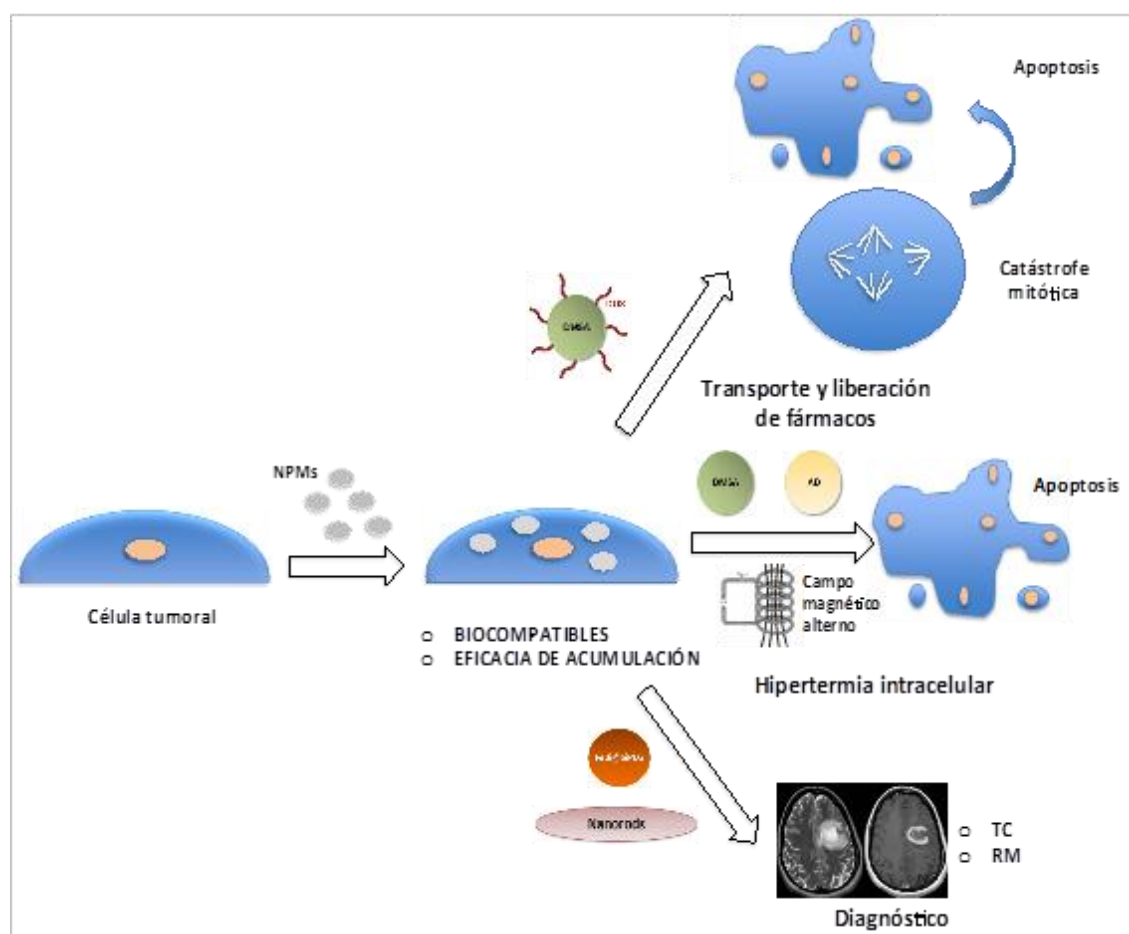
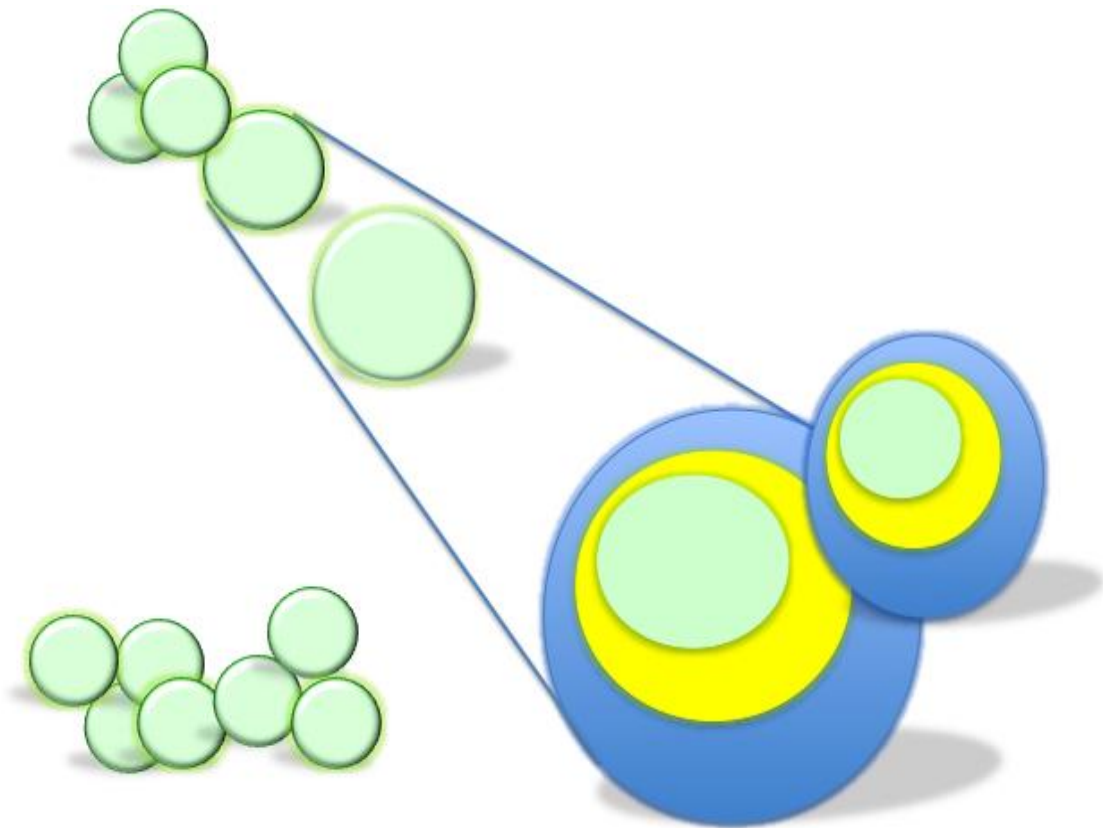


Figura 85.- Esquema representativo de las diferentes aplicaciones biomédicas dependiendo del tipo de nanopartícula magnética empleada en este estudio.

Sin duda, parece que en un futuro no muy lejano, se podrán diseñar nanoplateformas que actúen como “caballos de Troya” una vez que se hayan acumulado en las células tumorales. Evidentemente, se requieren muchas investigaciones de carácter interdisciplinar antes de su aplicación clínica. Sin embargo, el espectacular desarrollo que está experimentando la Nanotecnología en los últimos años, puede acortar el tiempo de espera como ya se ha propuesto: *Nanotechnology. Nanoparticle Trojan horses gallop from the lab into the clinic*¹⁹³.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONS



Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. El grado de acumulación de las nanopartículas magnéticas en el interior de las células HeLa depende de: i) el tipo de cubierta, ii) la concentración y iii) el tiempo de incubación de las nanopartículas. La eficacia de acumulación fue mayor para las recubiertas de aminopropilsilano (APS), seguidas de las revestidas de aminodextrano (AD), ambas cargadas positivamente, las aniónicas recubiertas de ácido dimercaptosuccínico (DMSA) y de heparina (H), mientras que las neutras con una cubierta de dextrano (D), no se internalizaban.
2. La eficacia de acumulación también depende de la línea celular utilizada, acumulándose mayor cantidad de nanopartículas revestidas de DMSA en las células HeLa que en las MCF-7.
3. Las nanopartículas magnéticas entran en las células mediante endocitosis, concretamente macropinocitosis y endocitosis mediada por clatrina, en función del tamaño de los agregados que formen las nanopartículas.
4. Las nanopartículas magnéticas se localizan mayoritariamente en los compartimentos ácidos, en todas las líneas celulares ensayadas.
5. Todas las nanopartículas -sin funcionalizar con fármacos- ensayados en el presente estudio, han demostrado ser biocompatibles en los distintos ensayos multiparamétricos empleados: análisis de la morfología celular, del citoesqueleto y del ciclo celular; detección de especies reactivas de oxígeno y test de viabilidad (MTT y azul Tripán), exceptuando las recubiertas de heparina en las células HeLa.
6. Las nanopartículas de DMSA son excelentes plataformas para unir covalentemente el fármaco anti-neoplásico doxorubicina (DOX). De los tres tipos de enlaces ensayados, el

enlace sensible tanto a pH ácido como a un ambiente reductor (MNP-I-DOX), ha demostrado ser el más eficaz, ya que la DOX es capaz de liberarse de las nanopartículas y alcanzar el núcleo de las células MDA-MB-231, reduciendo la viabilidad celular aproximadamente un 40%.

7. Las nanopartículas DMSA funcionalizadas covalentemente con DOX (MNP-I-DOX), inducen una muerte mayoritaria por catástrofe mitótica y en menor proporción apoptótica, en células MDA-MB-231.
8. Los ensayos con las mamóferas generadas por las células MDA-MB-231, indican que las nanopartículas DMSA funcionalizadas covalentemente con la DOX (MNP-I-DOX) pueden inducir una muerte por apoptosis en estas estructuras celulares tridimensionales.
9. Las nanopartículas funcionalizadas MNP-I-DOX son capaces de reducir la actividad de las células madres tumorales de la línea celular MDA-MB-231 y de las células de un cultivo primario procedente de una muestra clínica.
10. Las nanopartículas recubiertas de AD y DMSA pueden inducir una muerte celular por apoptosis cuando se les aplica un campo magnético alterno externo.
11. Las nanopartículas revestidas de bismuto y los nanorods pueden ser usadas como agentes de contraste para el diagnóstico mediante imagen.

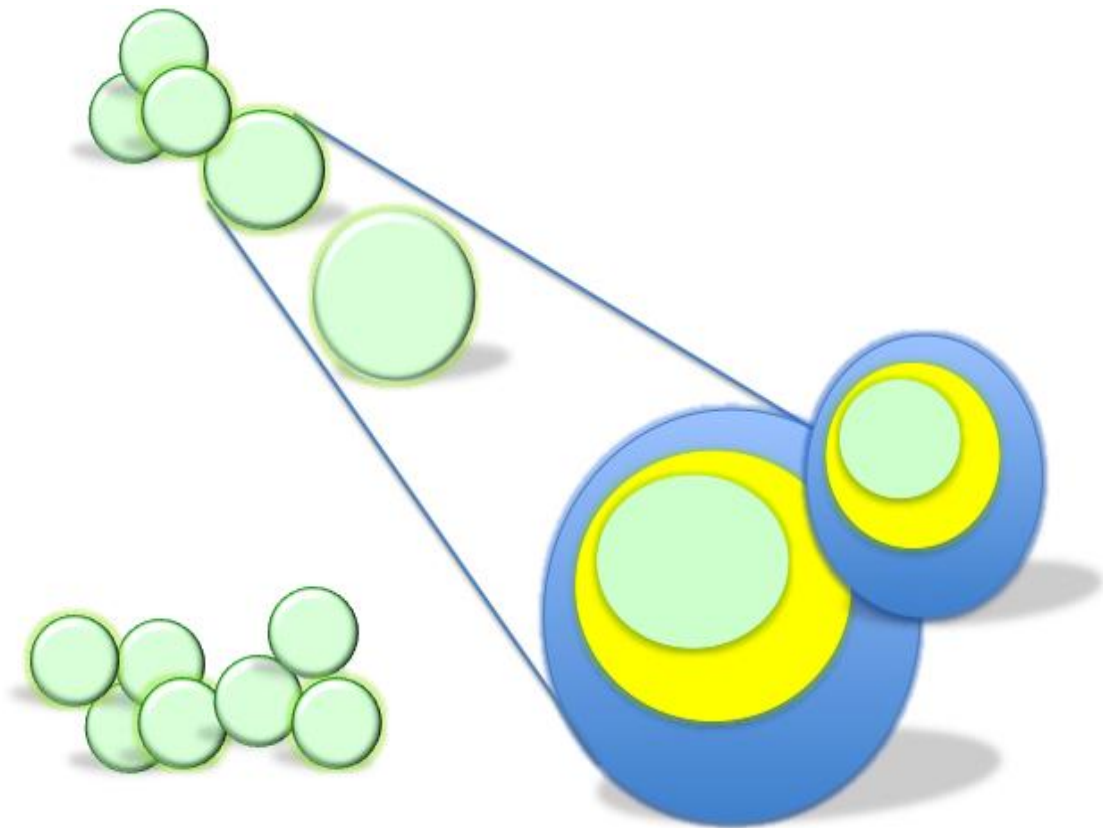
Conclusions

Based on the results obtained in this PhD Thesis, the following conclusions can be drawn:

1. The degree of accumulation of studied nanoparticles within HeLa cells depends on: i) type of coating, ii) concentration, and iii) incubation time. Aminopropylsilane (APS)-coated nanoparticles resulted in the greatest accumulation efficacy, followed by the aminodextran (AD)-coated nanoparticles, both positively charged, anionic dimercaptosuccinic acid (DMSA)-coated and heparin (H)-coated nanoparticles, while nanoparticles with a neutral dextran (D) coating were not internalized.
2. Accumulation efficacy also depends on the cell line used. Number of DMSA-coated nanoparticles accumulated is greater in HeLa cells than in MCF-7.
3. Magnetic nanoparticles enter cells by endocytosis, specifically macropinocytosis and clathrin-mediated endocytosis, depending on the size of the aggregates that form the nanoparticles.
4. Magnetic nanoparticles are located in acidic compartments on all cell lines tested.
5. All nanoparticles (not functionalized with drugs) used in the present study have demonstrated their biocompatibility in multi-parameter assays developed: cellular morphology analysis; cytoskeleton and cell cycle; reactive oxygen species detection and viability tests (MTT and Trypan blue), except for heparin-coated HeLa cells.
6. DMSA-coated nanoparticles are excellent platforms to attach covalently to the antineoplastic drug doxorubicin (DOX). The linker sensitive, both acid pH and a reducing environment (MNP-I-DOX), has proven to be the most effective linker out of the three tested liners, as the DOX is able to release and translocate to the nucleus inside the MDA-MB-231 cells, reducing cell viability to approximately 40%.

7. DMSA-coated nanoparticles covalently functionalized with DOX (MNP-I-DOX) can induce cell death by mitotic catastrophe (majority), and apoptosis (smaller proportion) in MDA-MB-231 cells.
8. Experiments with mammospheres generated by MDA-MB-231 cells, show that DMSA-coated nanoparticles covalently functionalized with DOX (MNP-I-DOX) can induce cell death by apoptosis in these three-dimensional cellular structures.
9. Nanoparticles functionalized with DOX (MNP-I-DOX) are able to reduce cancer stem cell activity of the MDA-MB-231 cell line and primary cell cultures from a clinical sample.
10. AD- and DMSA-coated nanoparticles can induce cell death by apoptosis when an alternating magnetic field is applied.
11. Bismuth-coated nanoparticles and nanorods can be used as contrast agents for image diagnosis.

BIBLIOGRAFÍA



1. Chun YW, Crowder SW, Mehl SC, Wang X, Bae H, Sung H-J. Therapeutic application of nanotechnology in cardiovascular and pulmonary regeneration. *Comput Struct Biotechnol J*. **2013**, 7: 1-7.
2. Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* **2005**, 26: 3995-4021.
3. Scheinberg DA, Villa CH, Escorcía FE, McDevitt MR. Conscripts of the infinite armada: systemic cancer therapy using nanomaterials. *Nat Rev Clin Oncol*. **2010**, 7: 266-276.
4. Li L, Jiang W, Luo K, Song H, Lan F, Wu Y, Gu Z. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles as MRI contrast agents for Non-invasive Stem Cell Labeling and Tracking. *Theranostics* **2013**, 3: 595-615.
5. Umut E. In *Modern surface engineering treatment. Surface Modification of Nanoparticles Used in Biomedical Applications* (Edited by M. Aliofkhazraei.-InTech) 8, 185-208 (**2013**).
6. Li Y, Chen Z, Gu N. In vitro biological effects of magnetic nanoparticles. *Chinese Science Bulletin* **2012**, 57: 3972-3978.
7. Panariti A, Miserocchi G, Rivolta I. The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: disrupting or enabling functions? *Nanotechnol Sci Appl*. **2012**, 5: 87-100.
8. Calero M, Gutiérrez L, Salas G, Luengo Y, Lázaro A, Acedo P, Morales MP, Miranda R, Villanueva A. Efficient and safe internalization of magnetic iron oxide nanoparticles: two fundamental requirements for biomedical applications. *Nanomedicine* **2014**, 10: 733-743.
9. Mulens V, Morales MdP, Barber DF. Development of magnetic nanoparticles for cancer gene therapy: A comprehensive review. *ISRN Nanomaterials* **2013**, 2013.
10. Canton I, Battaglia G. Endocytosis at the nanoscale. *Chem Soc Rev*. **2012**, 41: 2718-2739.
11. Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small* **2008**, 4: 26-49.
12. Fang M, Peng C, Pang DW, Li Y. Quantum Dots for Cancer Research: Current Status, Remaining Issues, and Future Perspectives. *Cancer Biol Med*. **2012**, 9: 151-163.
13. Nazir S, Hussain T, Ayub A, Rashid U, MacRobert AJ. Nanomaterials in combating cancer: therapeutic applications and developments. *Nanomedicine* **2014**, 10: 19-34.
14. Madaan K, Kumar S, Poonia N, Lather V, Pandita D. Dendrimers in drug delivery and targeting: Drug-dendrimer interactions and toxicity issues. *J Pharm Bioallied Sci*. **2014**, 6: 139-150.
15. Schwerdtfeger P, Wirz LN, Avery J. The topology of fullerenes. *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci*. **2015**, 5: 96-145.
16. Talluri SV, Kuppusamy G, Reddy Karri VV, Tummala S, Madhunapantula SV. Lipid-based nanocarriers for breast cancer treatment - comprehensive review. *Drug Deliv*. **2015**: 1-15.
17. Colombo M, Carregal-Romero S, Casula MF, Gutierrez L, Morales MP, Böhm IB, Heverhagen JT, Prosperi D, Parak WJ. Biological applications of magnetic nanoparticles. *Chem Soc Rev*. **2012**, 41: 4306-4334.

18. Villanueva A, Canete M, Roca AG, Calero M, Veintemillas-Verdaguer S, Serna CJ, del Puerto Morales M, Miranda R. The influence of surface functionalization on the enhanced internalization of magnetic nanoparticles in cancer cells. *Nanotechnology* **2009**, 20: 115103.
19. Estelrich J, Escribano E, Queralt J, Busquets MA. Iron oxide nanoparticles for magnetically-guided and magnetically-responsive drug delivery. *Int J Mol Sci.* **2015**, 16: 8070-8101.
20. Weissleder Ra, Stark DD, Engelstad BL, Bacon BR, Compton CC, White DL, Jacobs P, Lewis J. Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *AJR Am J Roentgenol.* **1989**, 152: 167-173.
21. Conde J, Dias JT, Grazu V, Moros M, Baptista PV, de la Fuente JM. Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine. *Front Chem.* **2014**, 2: 48.
22. Toporkiewicz M, Meissner J, Matusewicz L, Czogalla A, Sikorski AF. Toward a magic or imaginary bullet? Ligands for drug targeting to cancer cells: principles, hopes, and challenges. *Int J Nanomedicine* **2015**, 10: 1399-1414.
23. Mou X, Ali Z, Li S, He N. Applications of Magnetic Nanoparticles in Targeted Drug Delivery System. *J Nanosci Nanotechnol.* **2015**, 15: 54-62.
24. Shen Z, Wu H, Yang S, Ma X, Li Z, Tan M, Wu A. A novel Trojan-horse targeting strategy to reduce the non-specific uptake of nanocarriers by non-cancerous cells. *Biomaterials* **2015**, 70: 1-11.
25. Nitiss KC, Nitiss JL. Twisting and ironing: doxorubicin cardiotoxicity by mitochondrial DNA damage. *Clin Cancer Res.* **2014**, 20: 4737-4739.
26. Won HS, Lee KE, Sung SH, Choi MY, Jo JY, Nam EM, Mun YC, Seong CM, Lee SN. Topoisomerase II alpha and microtubule-associated protein-tau as a predictive marker in axillary lymph node positive breast cancer. *Tumori* **2014**, 100: 80-86.
27. Verma A, Stellacci F. Effect of surface properties on nanoparticle–cell interactions. *Small* **2010**, 6: 12-21.
28. Cabrera M, Ungermann C. Guiding endosomal maturation. *Cell* **2010**, 141: 404-406.
29. Sahay G, Alakhova DY, Kabanov AV. Endocytosis of nanomedicines. *J Control Release* **2010**, 145: 182-195.
30. Ruiz A, Salas G, Calero M, Hernández Y, Villanueva A, Herranz F, Veintemillas-Verdaguer S, Martínez E, Barber DF, Morales MP. Short-chain PEG molecules strongly bound to magnetic nanoparticle for MRI long circulating agents. *Acta biomater.* **2013**, 9: 6421-6430.
31. Thakor AS, Gambhir SS. Nanooncology: the future of cancer diagnosis and therapy. *CA Cancer J Clin.* **2013**, 63: 395-418.
32. Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J Phys D: Appl Phys.* **2003**, 36: R167.
33. Lee DE, Koo H, Sun IC, Ryu JH, Kim K, Kwon IC. Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis. *Chem Soc Rev.* **2012**, 41: 2656-2672.

34. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* **2011**, 61: 69-90.
35. Walters S, Maringe C, Butler J, Rachet B, Barrett-Lee P, Bergh J, Boyages J, Christiansen P, Lee M, Warnberg F, Allemani C, Engholm G, Fornander T, Gjerstorff ML, Johannesen TB, Lawrence G, McGahan CE, Middleton R, Steward J, Tracey E, Turner D, Richards MA, Coleman MP. Breast cancer survival and stage at diagnosis in Australia, Canada, Denmark, Norway, Sweden and the UK, 2000-2007: a population-based study. *Br J Cancer* **2013**, 108: 1195-1208.
36. Rebolledo AF, Laurent S, Calero M, Villanueva A, Knobel M, Marco JF, Tartaj P. Iron oxide nanosized clusters embedded in porous nanorods: a new colloidal design to enhance capabilities of MRI contrast agents. *ACS Nano* **2010**, 4: 2095-2103.
37. Veintemillas-Verdaguer S, Luengo Y, Serna CJ, Andrés-Vergés M, Varela M, Calero M, Lazaro-Carrillo A, Villanueva A, Sisniega A, Montesinos P. Bismuth labeling for the CT assessment of local administration of magnetic nanoparticles. *Nanotechnology* **2015**, 26: 135101.
38. Burtea C, Laurent S, Mahieu I, Larbanoix L, Roch A, Port M, Rousseaux O, Ballet S, Murariu O, Toubreau G. In vitro biomedical applications of functionalized iron oxide nanoparticles, including those not related to magnetic properties. *Contrast Media Mol Imaging* **2011**, 6: 236-250.
39. Weissleder R, Bogdanov A, Papisov M. Drug targeting in magnetic resonance imaging. *Magn Reson Q.* **1992**, 8: 55-63.
40. Gilchrist RK, Medal R, Shorey WD, Hanselman RC, Parrott JC, Taylor CB. Selective inductive heating of lymph nodes. *Ann Surg.* **1957**, 146: 596-606.
41. Dewhurst MW, Viglianti BL, Lora-Michiels M, Hanson M, Hoopes PJ. Basic principles of thermal dosimetry and thermal thresholds for tissue damage from hyperthermia. *Int J Hyperthermia* **2003**, 19: 267-294.
42. Tagami T, Ernsting MJ, Li S-D. Efficient tumor regression by a single and low dose treatment with a novel and enhanced formulation of thermosensitive liposomal doxorubicin. *J Control Release* **2011**, 152: 303-309.
43. Bucak S, Sezer AD, Yavuztürk B. In *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems. Magnetic nanoparticles: synthesis, surface modifications and application in drug delivery* (Edited by AD Sezer.- InTech) 7, 165-200, (2012).
44. Attaluri A, Kandala SK, Wabler M, Zhou H, Cornejo C, Armour M, Hedayati M, Zhang Y, DeWeese TL, Herman C, Ivkov R. Magnetic nanoparticle hyperthermia enhances radiation therapy: A study in mouse models of human prostate cancer. *Int J Hyperthermia* **2015**, 31: 359-374.
45. Kossatz S, Grandke J, Couleaud P, Latorre A, Aires A, Crosbie-Staunton K, Ludwig R, Dahring H, Ettelt V, Lazaro-Carrillo A, Calero M, Sader M, Courty J, Volkov Y, Prina-Mello A, Villanueva A, Somoza A, Cortajarena AL, Miranda R, Hilger I. Efficient treatment of breast cancer xenografts with multifunctionalized iron oxide nanoparticles combining magnetic hyperthermia and anti-cancer drug delivery. *Breast Cancer Res.* **2015**, 17: 66.
46. Johannsen M, Thiesen B, Wust P, Jordan A. Magnetic nanoparticle hyperthermia for prostate cancer. *Int J Hyperthermia* **2010**, 26: 790-795.

47. Maier-Hauff K, Ulrich F, Nestler D, Niehoff H, Wust P, Thiesen B, Orawa H, Budach V, Jordan A. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.* **2011**, 103: 317-324.
48. Matsumine A, Takegami K, Asanuma K, Matsubara T, Nakamura T, Uchida A, Sudo A. A novel hyperthermia treatment for bone metastases using magnetic materials. *Int J Clin Oncol.* **2011**, 16: 101-108.
49. Silva AC, Oliveira TR, Mamani JB, Malheiros SM, Malavolta L, Pavon LF, Sibov TT, Amaro Jr E, Tannus A, Vidoto EL. Application of hyperthermia induced by superparamagnetic iron oxide nanoparticles in glioma treatment. *Int J Nanomedicine* **2011**, 6: 591-603.
50. Li Y, Wang J, Wientjes MG, Au JLS. Delivery of nanomedicines to extracellular and intracellular compartments of a solid tumor. *Adv Drug Deliv Rev.* **2012**, 64: 29-39.
51. Schneckeburger M, Dicato M, Diederich M. Plant-derived epigenetic modulators for cancer treatment and prevention. *Biotechnol Adv.* **2014**, 32: 1123-1132.
52. Schroeder A, Heller DA, Winslow MM, Dahlman JE, Pratt GW, Langer R, Jacks T, Anderson DG. Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nat Rev Cancer* **2012**, 12: 39-50.
53. Maeda H. The link between infection and cancer: tumor vasculature, free radicals, and drug delivery to tumors via the EPR effect. *Cancer Sci.* **2013**, 104: 779-789.
54. Theek B, Gremse F, Kunjachan S, Fokong S, Pola R, Pechar M, Deckers R, Storm G, Ehling J, Kiessling F. Characterizing EPR-mediated passive drug targeting using contrast-enhanced functional ultrasound imaging. *J Control Release* **2014**, 182: 83-89.
55. Mejías R, Pérez-Yagüe S, Gutiérrez L, Cabrera LI, Spada R, Acedo P, Serna CJ, Lázaro FJ, Villanueva Á, del Puerto Morales M. Dimercaptosuccinic acid-coated magnetite nanoparticles for magnetically guided in vivo delivery of interferon gamma for cancer immunotherapy. *Biomaterials* **2011**, 32: 2938-2952.
56. Liu J, Huang Y, Kumar A, Tan A, Jin S, Mozhi A, Liang X-J. pH-Sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy. *Biotechnol Adv.* **2014**, 32: 693-710.
57. Menon JU, Jadeja P, Tambe P, Vu K, Yuan B, Nguyen KT. Nanomaterials for photo-based diagnostic and therapeutic applications. *Theranostics* **2013**, 3: 152-166.
58. Kapse-Mistry S, Govender T, Srivastava R, Yergeri M. Nanodrug delivery in reversing multidrug resistance in cancer cells. *Front Pharmacol.* **2014**, 5: 159.
59. Hood E. Nanotechnology: looking as we leap. *Environ Health Perspect.* **2004**, 112: A740-749.
60. Hoet PH, Nemmar A, Nemery B. Health impact of nanomaterials? *Nat Biotechnol.* **2004**, 22: 19.
61. Bruinink A, Wang J, Wick P. Effect of particle agglomeration in nanotoxicology. *Arch Toxicol.* **2015**, 89: 659-675.
62. Sanhai WR, Sakamoto JH, Canady R, Ferrari M. Seven challenges for nanomedicine. *Nat Nanotechnol.* **2008**, 3: 242-244.

63. Yoo D, Jeong H, Preihs C, Choi Js, Shin TH, Sessler JL, Cheon J. Double-Effector Nanoparticles: A Synergistic Approach to Apoptotic Hyperthermia. *Angew Chem Int Ed Engl*. **2012**, 51: 12482-12485.
64. Papageorgiou I, Brown C, Schins R, Singh S, Newson R, Davis S, Fisher J, Ingham E, Case CP. The effect of nano-and micron-sized particles of cobalt–chromium alloy on human fibroblasts in vitro. *Biomaterials* **2007**, 28: 2946-2958.
65. Karlsson HL, Cronholm P, Gustafsson J, Moller L. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem Res Toxicol*. **2008**, 21: 1726-1732.
66. Shi J, Sun X, Lin Y, Zou X, Li Z, Liao Y, Du M, Zhang H. Endothelial cell injury and dysfunction induced by silver nanoparticles through oxidative stress via IKK/NF- κ B pathways. *Biomaterials* **2014**, 35: 6657-6666.
67. Stone V, Donaldson K. Nanotoxicology: signs of stress. *Nat Nanotechnol*. **2006**, 1: 23-24.
68. Winterbourn CC. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett*. **1995**, 82-83: 969-974.
69. Laurent S, Burtea C, Thirifays C, Häfeli UO, Mahmoudi M. Crucial ignored parameters on nanotoxicology: the importance of toxicity assay modifications and “cell vision”. *PLoS One* **2012**, 7: e29997.
70. Reddy LH, Arias JL, Nicolas J, Couvreur P. Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chem Rev*. **2012**, 112: 5818-5878.
71. Duguet E, Vasseur S, Mornet S, Devoisselle J-M. Magnetic nanoparticles and their applications in medicine. *Nanomedicine* **2006**, 1: 157-168.
72. Elias A, Tsourkas A. Imaging circulating cells and lymphoid tissues with iron oxide nanoparticles. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. **2009**, 2009: 720-726.
73. Corchero JL, Villaverde A. Biomedical applications of distally controlled magnetic nanoparticles. *Trends Biotechnol*. **2009**, 27: 468-476.
74. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*. **2012**, 19: 107-120.
75. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif*. **2012**, 45: 487-498.
76. Fuchs Y, Steller H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2015**, 16: 329-344.
77. Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2011**, 12: 385-392.
78. Holst CM, Oredsson SM. Comparison of three cytotoxicity tests in the evaluation of the cytotoxicity of a spermine analogue on human breast cancer cell lines. *Toxicol In Vitro* **2005**, 19: 379-387.

79. Pattabiraman DR, Weinberg RA. Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose? *Nat Rev Drug Discov.* **2014**, 13: 497-512.
80. Jiang W, Peng J, Zhang Y, Cho WC, Jin K. The implications of cancer stem cells for cancer therapy. *Int J Mol Sci.* **2012**, 13: 16636-16657.
81. Valent P, Bonnet D, De Maria R, Lapidot T, Copland M, Melo JV, Chomienne C, Ishikawa F, Schuringa JJ, Stassi G. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat Rev Cancer* **2012**, 12: 767-775.
82. Chen K, Huang YH, Chen JL. Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacol Sin.* **2013**, 34: 732-740.
83. Li HZ, Yi TB, Wu ZY. Suspension culture combined with chemotherapeutic agents for sorting of breast cancer stem cells. *BMC Cancer* **2008**, 8: 135.
84. Sergeant G, Vankelecom H, Gremaux L, Topal B. Role of cancer stem cells in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Clin Oncol.* **2009**, 6: 580-586.
85. Hwang E-S, Naeger LK, DiMaio D. Activation of the endogenous p53 growth inhibitory pathway in HeLa cervical carcinoma cells by expression of the bovine papillomavirus E2 gene. *Oncogene* **1996**, 12: 795-803.
86. Mizukami S, Kikuchi K, Higuchi T, Urano Y, Mashima T, Tsuruo T, Nagano T. Imaging of caspase-3 activation in HeLa cells stimulated with etoposide using a novel fluorescent probe. *FEBS Lett.* **1999**, 453: 356-360.
87. Subik K, Lee J-F, Baxter L, Strzepek T, Costello D, Crowley P, Xing L, Hung M-C, Bonfiglio T, Hicks DG. The expression patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by immunohistochemical analysis in breast cancer cell lines. *Breast Cancer* **2010**, 4: 35-41.
88. Yang S, Liu J, Thor AD, Yang X. Caspase expression profile and functional activity in a panel of breast cancer cell lines. *Oncol Rep.* **2007**, 17: 1229-1235.
89. Jänicke RU. MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3. *Breast Cancer Res Treat.* **2009**, 117: 219-221.
90. Lacroix M, Toillon R-A, Leclercq G. p53 and breast cancer, an update. *Endocr Relat Cancer* **2006**, 13: 293-325.
91. Imbalzano KM, Tatarkova I, Imbalzano AN, Nickerson JA. Increasingly transformed MCF-10A cells have a progressively tumor-like phenotype in three-dimensional basement membrane culture. *Cancer Cell Int.* **2009**, 9: 7.
92. Cengelli F, Grzyb JA, Montoro A, Hofmann H, Hanessian S, Juillerat-Jeanneret L. Surface-Functionalized Ultrasmall Superparamagnetic Nanoparticles as Magnetic Delivery Vectors for Camptothecin. *ChemMedChem.* **2009**, 4: 988-997.
93. Riemer J, Hoepken HH, Czerwinska H, Robinson SR, Dringen R. Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells. *Anal Biochem.* **2004**, 331: 370-375.

94. Kim J-S, Yoon T-J, Yu K-N, Noh MS, Woo M, Kim B-G, Lee K-H, Sohn B-H, Park S-B, Lee J-K. Cellular uptake of magnetic nanoparticle is mediated through energy-dependent endocytosis in A549 cells. *J Vet Sci.* **2006**, 7: 321-326.
95. Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med.* **1999**, 27: 612-616.
96. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **1983**, 65: 55-63.
97. Tolnai S. A method for viable cell count. *Methods Cell Sci.* **1975**, 1: 37-38.
98. Shaw FL, Harrison H, Spence K, Ablett MP, Simoes BM, Farnie G, Clarke RB. A detailed mammosphere assay protocol for the quantification of breast stem cell activity. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **2012**, 17: 111-117.
99. AshaRani PV, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveetil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* **2008**, 3: 279-290.
100. Seabra AB, Durán N. Nanotoxicology of Metal Oxide Nanoparticles. *Metals* **2015**, 5: 934-975.
101. Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* **2006**, 311: 622-627.
102. Xia T, Li N, Nel AE. Potential health impact of nanoparticles. *Annu Rev Public Health* **2009**, 30: 137-150.
103. Mahmood M, Casciano DA, Mocan T, Iancu C, Xu Y, Mocan L, Iancu DT, Dervishi E, Li Z, Abdalmuhsen M. Cytotoxicity and biological effects of functional nanomaterials delivered to various cell lines. *J Appl Toxicol.* **2010**, 30: 74-83.
104. Soenen SJH, Himmelreich U, Nuytten N, De Cuyper M. Cytotoxic effects of iron oxide nanoparticles and implications for safety in cell labelling. *Biomaterials* **2011**, 32: 195-205.
105. Limbach LK, Wick P, Manser P, Grass RN, Bruinink A, Stark WJ. Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. *Environ Sci Technol.* **2007**, 41: 4158-4163.
106. Wilhelm C, Billotey C, Roger J, Pons JN, Bacri JC, Gazeau F. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials* **2003**, 24: 1001-1011.
107. Bertorelle F, Wilhelm C, Roger J, Gazeau F, Ménager C, Cabuil V. Fluorescence-modified superparamagnetic nanoparticles: intracellular uptake and use in cellular imaging. *Langmuir* **2006**, 22: 5385-5391.
108. Rivière C, Wilhelm C, Cousin F, Dupuis V, Gazeau F, Perzynski R. Internal structure of magnetic endosomes. *Eur Phys J E Soft Matter* **2007**, 22: 1-10.
109. Fan C, Gao W, Chen Z, Fan H, Li M, Deng F, Chen Z. Tumor selectivity of stealth multi-functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Int J Pharm.* **2011**, 404: 180-190.

110. Nazli C, Ergenc TI, Yar Y, Acar HY, Kizilel S. RGDS-functionalized polyethylene glycol hydrogel-coated magnetic iron oxide nanoparticles enhance specific intracellular uptake by HeLa cells. *Int J Nanomedicine* **2012**, 7: 1903-1920.
111. Arbab AS, Bashaw LA, Miller BR, Jordan EK, Lewis BK, Kalish H, Frank JA. Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging 1. *Radiology* **2003**, 229: 838-846.
112. Calero M, Chiappi M, Lazaro-Carrillo A, Rodriguez MJ, Chichon FJ, Crosbie-Staunton K, Prina-Mello A, Volkov Y, Villanueva A, Carrascosa JL. Characterization of interaction of magnetic nanoparticles with breast cancer cells. *J Nanobiotechnology* **2015**, 13: 16.
113. Gu J, Xu H, Han Y, Dai W, Hao W, Wang C, Gu N, Xu H, Cao J. The internalization pathway, metabolic fate and biological effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the macrophage-like RAW264. 7 cell. *Sci China Life Sci.* **2011**, 54: 793-805.
114. Mahajan S, Koul V, Choudhary V, Shishodia G, Bharti AC. Preparation and in vitro evaluation of folate-receptor-targeted SPION-polymer micelle hybrids for MRI contrast enhancement in cancer imaging. *Nanotechnology* **2013**, 24: 015603.
115. Pan B, Cui D, Sheng Y, Ozkan C, Gao F, He R, Li Q, Xu P, Huang T. Dendrimer-modified magnetic nanoparticles enhance efficiency of gene delivery system. *Cancer Res.* **2007**, 67: 8156-8163.
116. Qi L, Wu L, Zheng S, Wang Y, Fu H, Cui D. Cell-penetrating magnetic nanoparticles for highly efficient delivery and intracellular imaging of siRNA. *Biomacromolecules* **2012**, 13: 2723-2730.
117. Naqvi S, Samim M, Abdin MZ, Ahmed FJ, Maitra AN, Prashant CK, Dinda AK. Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. *Int J Nanomedicine* **2010**, 5: 983-989.
118. Cañete M, Soriano J, Villanueva A, Roca AG, Veintemillas S, Serna CJ, Miranda R, Del Puerto Morales M. The endocytic penetration mechanism of iron oxide magnetic nanoparticles with positively charged cover: a morphological approach. *Int J Mol Med.* **2010**, 26: 533-539.
119. Kenzaoui BH, Vilà MR, Miquel JM, Cengelli F, Juillerat-Jeanneret L. Evaluation of uptake and transport of cationic and anionic ultrasmall iron oxide nanoparticles by human colon cells. *Int J Nanomedicine* **2012**, 7: 1275-1286.
120. Hoet PHM, Brüske-Hohlfeld I, Salata OV. Nanoparticles-known and unknown health risks. *J Nanobiotechnology* **2004**, 2: 12.
121. Iversen T-G, Skotland T, Sandvig K. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: present knowledge and need for future studies. *Nano Today* **2011**, 6: 176-185.
122. Wilhelm C, Gazeau F. Universal cell labelling with anionic magnetic nanoparticles. *Biomaterials* **2008**, 29: 3161-3174.
123. Fernandez-Cobo M, Holland JF, Pogo BG. Transcription profiles of non-immortalized breast cancer cell lines. *BMC Cancer* **2006**, 6: 99.

124. Kavsan VM, Iershov AV , Balynska OV. Immortalized cells and one oncogene in malignant transformation: old insights on new explanation. *BMC Cell Biol.* **2011**, 12: 23.
125. Zhang Y, Yang M, Portney NG, Cui D, Budak G, Ozbay E, Ozkan M, Ozkan CS. Zeta potential: a surface electrical characteristic to probe the interaction of nanoparticles with normal and cancer human breast epithelial cells. *Biomedical microdevices* **2008**, 10: 321-328.
126. Xiao Y, Forry SP, Gao X, Holbrook RD, Telford WG, Tona A. Dynamics and mechanisms of quantum dot nanoparticle cellular uptake. *J Nanobiotechnology* **2010**, 8: 13.
127. Rejman J, Oberle V, Zuhorn I, Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin-and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J.* **2004**, 377: 159-169.
128. Könczöl M, Ebeling S, Goldenberg E, Treude F, Gminski R, Gieré R, Grobety B, Rothen-Rutishauser B, Merfort I, Mersch-Sundermann V. Cytotoxicity and genotoxicity of size-fractionated iron oxide (magnetite) in A549 human lung epithelial cells: role of ROS, JNK, and NF- κ B. *Chem Res Toxicol.* **2011**, 24: 1460-1475.
129. Kralj S, Rojnik M, Jagodič M, Kos J, Makovec D. Effect of surface charge on the cellular uptake of fluorescent magnetic nanoparticles. *J Nanopart Res.* **2012**, 14: 1-14.
130. Luengo Y, Nardecchia S, Morales MP, Serrano MC. Different cell responses induced by exposure to maghemite nanoparticles. *Nanoscale* **2013**, 5: 11428-11437.
131. Leroueil PR, Berry SA, Duthie K, Han G, Rotello VM, McNerny DQ, Baker JR Jr, Orr BG , Holl MM. Wide varieties of cationic nanoparticles induce defects in supported lipid bilayers. *Nano Lett.* **2008**, 8: 420-424.
132. Rello-Varona S, Gámez A, Moreno V, Stockert JC, Cristóbal J, Pacheco M, Cañete M, Juarranz Á, Villanueva Á. Metaphase arrest and cell death induced by etoposide on HeLa cells. *Int J Biochem Cell Biol.* **2006**, 38: 2183-2195.
133. Hernandez-Vargas H, Palacios J, Moreno-Bueno G. Molecular profiling of docetaxel cytotoxicity in breast cancer cells: uncoupling of aberrant mitosis and apoptosis. *Oncogene* **2007**, 26: 2902-2913.
134. Gupta AK, Curtis ASG. Surface modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: interaction studies with human fibroblasts in culture. *J Mater Sci Mater Med.* **2004**, 15: 493-496.
135. Apopa PL, Qian Y, Shao R, Guo NL, Schwegler-Berry D, Pacurari M, Porter D, Shi X, Vallyathan V, Castranova V. Iron oxide nanoparticles induce human microvascular endothelial cell permeability through reactive oxygen species production and microtubule remodeling. *Part Fibre Toxicol.* **2009**, 6: 1.
136. Wu X, Tan Y, Mao H, Zhang M. Toxic effects of iron oxide nanoparticles on human umbilical vein endothelial cells. *Int J Nanomedicine* **2010**, 5: 385-399.
137. Soenen SJH, Nuytten N, De Meyer SF, De Smedt SC, De Cuyper M. High Intracellular Iron Oxide Nanoparticle Concentrations Affect Cellular Cytoskeleton and Focal Adhesion Kinase-Mediated Signaling. *Small* **2010**, 6: 832-842.
138. Rodgers LS, Fanning AS. Regulation of epithelial permeability by the actin cytoskeleton. *Cytoskeleton* **2011**, 68: 653-660.

139. Ivanov AI, McCall IC, Parkos CA, Nusrat A. Role for actin filament turnover and a myosin II motor in cytoskeleton-driven disassembly of the epithelial apical junctional complex. *Mol Biol Cell*. **2004**, 15: 2639-2651.
140. Mahmoudi M, Azadmanesh K, Shokrgozar MA, Journeay WS, Laurent S. Effect of nanoparticles on the cell life cycle. *Chem Rev*. **2011**, 111: 3407-3432.
141. Xia JG, Zhang S, Zhang Y, Ma M, Gu N. Maghemite nanoparticles and their protamine derivatives: cellular internalization and effects on cell-cycle progress. *J Nanosci Nanotechnol*. **2009**, 9: 1025-1028.
142. Manke A, Wang L, Rojanasakul Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *Biomed Res Int*. **2013**, 2013: 942916.
143. Zuzana M, Alessandra R, Lise F, Maria D. Safety assessment of nanoparticles cytotoxicity and genotoxicity of metal nanoparticles in vitro. *J Biomed Nanotechnol*. **2011**, 7: 20-21.
144. Liu Y, Li X, Bao S, Lu Z, Li Q, Li CM. Plastic protein microarray to investigate the molecular pathways of magnetic nanoparticle-induced nanotoxicity. *Nanotechnology* **2013**, 24: 175501.
145. Singh N, Jenkins GJS, Asadi R, Doak SH. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Rev*. **2010**, 1: 5358.
146. Khan MI, Mohammad A, Patil G, Naqvi SAH, Chauhan LKS, Ahmad I. Induction of ROS, mitochondrial damage and autophagy in lung epithelial cancer cells by iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* **2012**, 33: 1477-1488.
147. Soenen SJH, De Cuyper M. How to assess cytotoxicity of (iron oxide-based) nanoparticles. A technical note using cationic magnetoliposomes. *Contrast Media Mol Imaging* **2011**, 6: 153-164.
148. Lee D-E, Koo H, Sun I-C, Ryu JH, Kim K, Kwon IC. Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis. *Chem Soc Rev*. **2012**, 41: 2656-2672.
149. Mahmoudi M, Hofmann H, Rothen-Rutishauser B, Petri-Fink A. Assessing the in vitro and in vivo toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Chem Rev*. **2011**, 112: 2323-2338.
150. Lanone S, Rogerieux F, Geys J, Dupont A, Maillot-Marechal E, Boczkowski J, Lacroix G, Hoet P. Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. *Part Fibre Toxicol*. **2009**, 6: 455-460.
151. Ahamed M. Toxic response of nickel nanoparticles in human lung epithelial A549 cells. *Toxicology In Vitro* **2011**, 25: 930-936.
152. Hoskins C, Wang L, Cheng WP, Cuschieri A. Dilemmas in the reliable estimation of the in-vitro cell viability in magnetic nanoparticle engineering: which tests and what protocols? *Nanoscale Res Lett*. **2012**, 7: 1-12.
153. Ruan J, Wang K, Song H, Xu X, Ji J, Cui D. Biocompatibility of hydrophilic silica-coated CdTe quantum dots and magnetic nanoparticles. *Nanoscale Res Lett*. **2011**, 6: 1-13.

154. Kim TH, Shin YJ, Won AJ, Lee BM, Choi WS, Jung JH, Chung HY, Kim HS. Resveratrol enhances chemosensitivity of doxorubicin in multidrug-resistant human breast cancer cells via increased cellular influx of doxorubicin. *Biochim Biophys Acta* **2014**, 1840: 615-625.
155. Rouhollah K, Pelin M, Serap Y, Gozde U, Ufuk G. Doxorubicin loading, release, and stability of polyamidoamine dendrimer-coated magnetic nanoparticles. *J Pharm Sci*. **2013**, 102: 1825-1835.
156. Kievit FM, Wang FY, Fang C, Mok H, Wang K, Silber JR, Ellenbogen RG, Zhang M. Doxorubicin loaded iron oxide nanoparticles overcome multidrug resistance in cancer in vitro. *J Control Release* **2011**, 152: 76-83.
157. Kaaki K, Hervé-Aubert K, Chiper M, Shkilnyy A, Soucé M, Benoit R, Paillard A, Dubois P, Saboungi M-L, Chourpa I. Magnetic nanocarriers of doxorubicin coated with poly (ethylene glycol) and folic acid: relation between coating structure, surface properties, colloidal stability, and cancer cell targeting. *Langmuir* **2011**, 28: 1496-1505.
158. Gautier J, Munnier E, Paillard A, Hervé K, Douziech-Eyrolles L, Soucé M, Dubois P, Chourpa I. A pharmaceutical study of doxorubicin-loaded PEGylated nanoparticles for magnetic drug targeting. *Int J Pharm*. **2012**, 423: 16-25.
159. Shkilnyy A, Munnier E, Hervé K, Soucé M, Benoit R, Cohen-Jonathan S, Limelette P, Saboungi M-L, Dubois P, Chourpa I. Synthesis and evaluation of novel biocompatible super-paramagnetic iron oxide nanoparticles as magnetic anticancer drug carrier and fluorescence active label. *J Phys Chem C* **2010**, 114: 5850-5858.
160. Bagherifam S, Skjeldal FM, Griffiths G, Maeldandsmo GM, Engebraten O, Nystrom B, Hasirci V, Hasirci N. pH-responsive nano carriers for doxorubicin delivery. *Pharm Res*. **2015**, 32: 1249-1263.
161. Mizutani H, Oikawa S, Hiraku Y, Murata M, Kojima M, Kawanishi S. Distinct mechanisms of site-specific oxidative DNA damage by doxorubicin in the presence of copper (II) and NADPH-cytochrome P450 reductase. *Cancer Sci*. **2003**, 94: 686-691.
162. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, Altman RB. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics* **2011**, 21: 440-446.
163. Zeybek A, Şanlı-Mohamed G, Ak G, Yılmaz H, Şanlıer ŞH. In vitro Evaluation of Doxorubicin-Incorporated Magnetic Albumin Nanospheres. *Chem Biol Drug Des*. **2014**, 84: 108-115.
164. Castedo M, Perfettini J-L, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* **2004**, 23: 2825-2837.
165. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. **2007**, 35: 495-516.
166. Eom Y-W, Kim MA, Park SS, Goo MJ, Kwon HJ, Sohn S, Kim W-H, Yoon G, Choi KS. Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. *Oncogene* **2005**, 24: 4765-4777.
167. Portugal J, Mansilla S, Bataller M. Mechanisms of drug-induced mitotic catastrophe in cancer cells. *Curr Pharm Des*. **2010**, 16: 69-78.
168. Mansilla S, Priebe W, Portugal J. Mitotic catastrophe results in cell death by caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Cell Cycle* **2006**, 5: 53-60.

169. Stevens JB, Liu G, Bremer SW, Karen JY, Xu W, Xu J, Sun Y, Wu GS, Savasan S, Krawetz SA. Mitotic cell death by chromosome fragmentation. *Cancer Res.* **2007**, 67: 7686-7694.
170. Zhang W, Qiao L, Wang X, Senthilkumar R, Wang F, Chen B. Inducing cell cycle arrest and apoptosis by dimercaptosuccinic acid modified Fe₃O₄ magnetic nanoparticles combined with nontoxic concentration of bortezomib and gambogic acid in RPMI-8226 cells. *Int J Nanomedicine* **2015**, 10: 3275-3289.
171. Zou Y, Liu P, Liu C-H, Zhi X-T. Doxorubicin-loaded mesoporous magnetic nanoparticles to induce apoptosis in breast cancer cells. *Biomed Pharmacother.* **2015**, 69: 355-360.
172. Nazli C, Demirer GS, Yar Y, Acar HY, Kizilel S. Targeted delivery of doxorubicin into tumor cells via MMP-sensitive PEG hydrogel-coated magnetic iron oxide nanoparticles (MIONPs). *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2014**, 122: 674-683.
173. Tomankova K, Polakova K, Pizova K, Binder S, Havrdova M, Kolarova M, Kriegova E, Zapletalova J, Malina L, Horakova J. In vitro cytotoxicity analysis of doxorubicin-loaded/superparamagnetic iron oxide colloidal nanoassemblies on MCF7 and NIH3T3 cell lines. *Int J Nanomedicine* **2015**, 10: 949-961.
174. Mueller-Klieser W. Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *Am J Physiol.* **1997**, 273: C1109-1123.
175. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA, Daidone MG. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res.* **2005**, 65: 5506-5511.
176. Sun TM, Wang YC, Wang F, Du JZ, Mao CQ, Sun CY, Tang RZ, Liu Y, Zhu J, Zhu YH, Yang XZ, Wang J. Cancer stem cell therapy using doxorubicin conjugated to gold nanoparticles via hydrazone bonds. *Biomaterials* **2014**, 35: 836-845.
177. Simões BM, Piva M, Iriondo O, Comaills V, López-Ruiz JA, Zabalza I, Mieza JA, Acinas O, dM Vivanco M. Effects of estrogen on the proportion of stem cells in the breast. *Breast Cancer Res. Treat.* **2011**, 129: 23-35.
178. Charoen KM, Fallica B, Colson YL, Zaman MH, Grinstaff MW. Embedded multicellular spheroids as a biomimetic 3D cancer model for evaluating drug and drug-device combinations. *Biomaterials* **2014**, 35: 2264-2271.
179. Dolfini E, Roncoroni L, Dogliotti E, Sala G, Erba E, Sacchi N, Ghidoni R. Resveratrol impairs the formation of MDA-MB-231 multicellular tumor spheroids concomitant with ceramide accumulation. *Cancer Lett.* **2007**, 249: 143-147.
180. Monsalve Y, Tosi G, Ruozi B, Belletti D, Vilella A, Zoli M, Vandelli MA, Forni F, Lopez BL, Sierra L. PEG-g-chitosan nanoparticles functionalized with the monoclonal antibody OX26 for brain drug targeting. *Nanomedicine* **2015**, 10: 1735-1750.
181. Garaio E, Sandre O, Collantes JM, Garcia JA, Mornet S, Plazaola F. Specific absorption rate dependence on temperature in magnetic field hyperthermia measured by dynamic hysteresis losses (ac magnetometry). *Nanotechnology* **2015**, 26: 015704.
182. Glory A, Bettaieb A, Averill-Bates DA. Mild thermotolerance induced at 40 degrees C protects cells against hyperthermia-induced pro-apoptotic changes in Bcl-2 family proteins. *Int J Hyperthermia* **2014**, 30: 502-512.

183. Liu R-t, Liu J, Tong J-q, Tang T, Kong W-C, Wang X-w, Li Y, Tang J-t. Heating effect and biocompatibility of bacterial magnetosomes as potential materials used in magnetic fluid hyperthermia. *Progress in Natural Science: Materials International* **2012**, 22: 31-39.
184. Burke AR, Singh RN, Carroll DL, Wood JC, D'Agostino RB Jr, Ajayan PM, Torti FM, Torti SV. The resistance of breast cancer stem cells to conventional hyperthermia and their sensitivity to nanoparticle-mediated photothermal therapy. *Biomaterials* **2012**, 33: 2961-2970.
185. Marcos-Campos I, Asin L, Torres TE, Marquina C, Tres A, Ibarra MR, Goya GF. Cell death induced by the application of alternating magnetic fields to nanoparticle-loaded dendritic cells. *Nanotechnology* **2011**, 22: 205101.
186. Asin L, Ibarra MR, Tres A, Goya GF. Controlled cell death by magnetic hyperthermia: effects of exposure time, field amplitude, and nanoparticle concentration. *Pharm Res.* **2012**, 29: 1319-1327.
187. Asin L, Goya GF, Tres A, Ibarra MR. Induced cell toxicity originates dendritic cell death following magnetic hyperthermia treatment. *Cell Death Dis.* **2013**, 4: e596.
188. Bolfarini GC, Siqueira-Moura MP, Demets GJ, Morais PC, Tedesco AC. In vitro evaluation of combined hyperthermia and photodynamic effects using magnetoliposomes loaded with cucurbituril zinc phthalocyanine complex on melanoma. *J Photochem Photobiology B.* **2012**, 115: 1-4.
189. Kulshrestha P, Gogoi M, Bahadur D, Banerjee R. In vitro application of paclitaxel loaded magnetoliposomes for combined chemotherapy and hyperthermia. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2012**, 96: 1-7.
190. Yan SY, Chen MM, Fan JG, Wang YQ, Du YQ, Hu Y, Xu LM. Therapeutic mechanism of treating SMMC-7721 liver cancer cells with magnetic fluid hyperthermia using Fe₂O₃ nanoparticles. *Braz J Med Biol Res.* **2014**, 47: 947-959.
191. Shetake NG, Kumar A, Gaikwad S, Ray P, Desai S, Ningthoujam RS, Vatsa RK, Pandey BN. Magnetic nanoparticle-mediated hyperthermia therapy induces tumour growth inhibition by apoptosis and Hsp90/AKT modulation. *Int J Hyperthermia* **2015**: 1-11.
192. Sadhukha T, Niu L, Wiedmann TS, Panyam J. Effective elimination of cancer stem cells by magnetic hyperthermia. *Mol Pharm.* **2013**, 10: 1432-1441.
193. Service RF. Nanotechnology. Nanoparticle Trojan horses gallop from the lab into the clinic. *Science* **2010**, 330: 314-315.

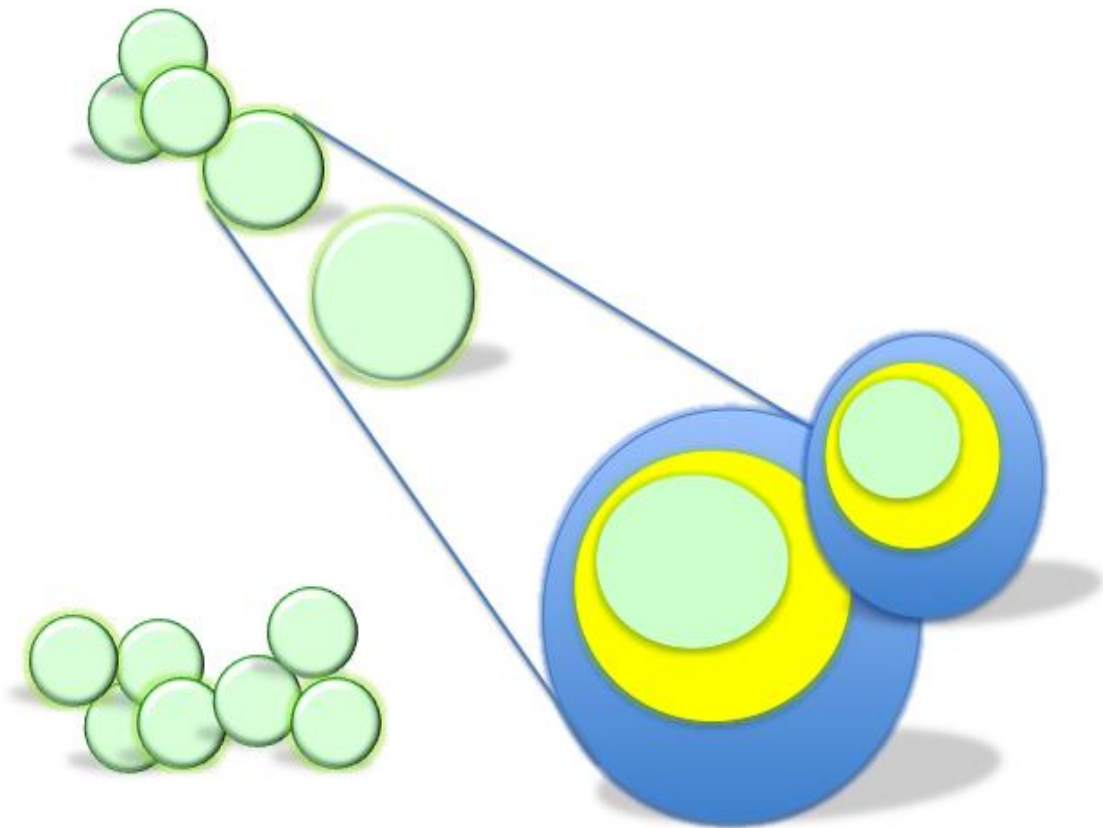
Publicadas

- Villanueva A, Cañete M, Roca AG, **Calero M**, Veintemillas-Verdaguer S, Serna CJ, Morales M del P, Miranda R (2009). *The influence of surface functionalization on the enhanced internalization of magnetic nanoparticles in cancer cells*. Nanotechnology 20: 115103. Índice de impacto: 3.821.
- Rebolledo AF, Laurent S, **Calero M**, Villanueva A, Knobel M, Marco JF, Tartaj P (2010). *Iron oxide nanosized clusters embedded in porous nanorods: a new colloidal design to enhance capabilities of MRI contrast agents*. ACS Nano 4: 2095-2103. Índice de impacto: 12.881.
- Ruíz A, Salas G, **Calero M**, Hernández Y, Villanueva A, Hernández F, Veintemillas-Verdaguer S, Martínez E, Barber DF, Morales MP (2013). *Short-chain PEG molecules strongly bound to magnetic nanoparticle for MRI long circulating agents*. Acta Biomaterialia 9: 6421-6430. Índice de impacto: 6.025.
- **Calero M**, Gutiérrez L, Salas G, Luengo Y, Lázaro A, Morales MP, Miranda R, Villanueva A (2014). *Efficient and Safe Internalization of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Two Fundamental Requirements for Biomedical Application*. Nanomedicine 10: 733-743. Índice de impacto: 6.155.
- Veintemillas-Verdaguer S, Luengo Y, Serna CJ, Andres-Vergés M, Varela M, **Calero M**, Lazaro-Carrillo A, Villanueva A, Sisniega A, Montesinos P, Morales MP (2015). *Bismuth labeling for the CT assessment of local administration of magnetic nanoparticles*. Nanotechnology 26: 135101. Índice de impacto: 3.821.
- **Calero M**, Chiappi M, Lázaro-Carrillo A, Rodríguez MJ, Chichón FJ, Crosbie-Staunton K, Prina-Mello A, Volkov Y, Villanueva A, Carrascosa JL (2015). *Characterization of interaction of magnetic nanoparticles with breast cancer cells*. Journal of Nanobiotechnology 13: 26. Índice de impacto: 4.120.
- Kossatz S, Couleaud P, Latorre A, Aires A, Crosbie-Staunton K, Ludwig R, Dähring H, Ettelt V, Grandke J, Lazaro-Carrillo A, **Calero M**, Sader M, Courty J, Volkov Y, Prina-Mello A, Villanueva A, Somoza A, Cortajarena AL, Miranda R, Hilge I. *Efficient treatment of breast cancer xenografts with multifunctionalized iron oxide nanoparticles combining magnetic hyperthermia and anti-cancer drug delivery*. Breast Cancer Research 17: 66. Índice de impacto: 5.490.

En proceso final de redacción

- **Calero M**, Simões B, Couleaud P, Latorre A, Aires A, Lazaro-Carrillo A, Somoza A, Lopez-Cortajarena A, Clarke R and Villanueva A. *Therapeutic evaluation of doxorubicin delivery by magnetic nanoparticles in breast cancer cells.*

AGRADECIMIENTOS



Los primeros agradecimientos son para Ángeles Villanueva, mi Tutora y Directora de Tesis. Después de estos largos y duros años de trabajo, quiero agradecerte el tiempo de dedicación, la paciencia y la confianza depositada en mí. Gracias por guiarme para tener esta formación profesional que tengo hoy en día. Asimismo, también quiero dar las gracias a los demás investigadores “senior” del grupo: la Dra. Magdalena Cañete y el Dr. Juan Carlos Stockert.

A todos mis compañeros del laboratorio que sin su ayuda, en muchos momentos de estos años, no hubiese sido podido seguir adelante con los experimentos, pero en especial a Jorge Soriano, que además de ser compañero de laboratorio, ha sido compañero de piso durante un año en el que hemos pasados muy buenos momentos de diversión y compañerismo, y del que tengo muy buenos recuerdos; a Ana Lázaro, que gracias a ella he podido seguir adelante, y además, todo el trabajo en el laboratorio ha sido más ameno y hemos sido muy eficaces. Y por todos los ratos de risas que hemos pasado, tanto en el trabajo como fuera de él; y a Daniela Castañeda que por un casual nos conocimos en el laboratorio cuando ella hacía unas prácticas para su Módulo y el destino quiso que nos volviésemos a encontrar, pero esta vez para convivir juntas, ser compañeras de piso y las mejores amigas. Gracias por estar siempre ahí y por tu atención en todos los momentos malos, de angustia y de estrés que he pasado, por apoyarme y consolarme. Sin ti, en muchos de ellos no hubiese tenido fuerzas para seguir. Nunca olvidaré estos años de convivencia y lo bien que lo hemos pasado en nuestras salidas.

A todos los compañeros de los diferentes laboratorios (A-102, A-110 y A-112) de nuestro pasillo de Citología, que me han dejado horas de microscopio cuando más las necesitaba, sin haberlas reservado.

Por otro lado, a todo el grupo de la Dra. Puerto Morales del ICMM-CSIC, pero en especial a la Dra. Lucía Gutiérrez, por todas esas horas de dedicación para poner a punto el *ensayo de la ferrocina* cuya finalidad era la cuantificación de hierro intracelular. Sin ella no hubiese sido posible ninguno de los resultados obtenidos, debido a que este ensayo ha sido muy importante para mi Tesis. Y como no, a la Dra. Puerto Morales, ya que ha sido la que ha cedido los diferentes tipos de nanopartículas magnéticas que se han utilizado para realizar todos los experimentos de este trabajo de investigación. También le quiero agradecer la compañía recibida durante todos los viajes a las

distintas ciudades europeas (Barcelona, Praga, Dublín, Jena...) para las reuniones del Proyecto Europeo Multifun y el apoyo recibido a la hora de la presentación de mis resultados antes los diferentes compañeros.

A todo el equipo de la Dra. Aitziber Cortajarena y Dr. Álvaro Somoza del IMDEA Nanociencia (Antonio Aires, Alfonso Latorre y Pierre Couleaud). Ellos han sido los que me han proporcionado las nanopartículas magnéticas funcionalizadas con el fármaco doxorrubicina para poder realizar los experimentos de mi segundo Capítulo de la Tesis. Los resultados han sido muy buenos y prometedores. Gracias chicos! También quiero agradecerles los buenos momentos vividos durante todos esos viajes de las reuniones del Proyecto Europeo Multifun. Asimismo, también quiero darles las gracias al Dr. Fran Terán y al Dr. Alberto Bollero por proporcionarnos el equipo para realizar parte de los experimentos de hipertermia del tercer Capítulo de la Tesis. Y como no, al director del IMDEA Nanociencia, el Dr. Rodolfo Miranda.

A todo el grupo del Dr. Guillermo Rivero, y entre ellos, a la Dra. Marta Multigner. Con ellos iniciamos los ensayos de hipertermia intracelular en las células y obtuvimos muy buenos resultados. Siempre recordaré esas idas en coche con Ángeles llevando las células hasta el IMA.

A todo el equipo del Dr. Robert Clarke del Institut of Cancer Science de la Universidad de Manchester, por toda la ayuda recibida para conocer algo de las células madres tumorales del cáncer de mama y aprender la técnica del *ensayo de las mamoesferas*. Gracias por hacerme pasar la mejor estancia que se pueda tener. Esos tres meses fueron inolvidables y la gente que conocí y la amistad que hice allí, aún más. Se pasaron volando, cuando me di cuenta ya tenía que volver a España. En especial al Dr. Bruno Simões y a Aida Sarmiento, con los que he pasado momentos geniales y me han ayudado tanto allí, como desde allí, cuando yo estaba ya en España.

Por otra parte, y como no, a todo el personal encargado de los diferentes servicios utilizados: Esperanza Salvador de Microscopía electrónica de barrido de la UAM, por todas las horas delante del microscopio dejándose la vista para que obtuviésemos las mejores fotos; Cristina Patiño de Microscopía electrónica de transmisión del CNB, por todas las imágenes proporcionadas del interior celular; Sylvia Gutiérrez de Microscopía Confocal del CNB, por esas impresionantes fotos de

fluorescencia y por todos los consejos dados para que siempre obtuviésemos los mejores resultados; Carmen Moreno de Citometría de flujo del CNB, por todas las veces que hemos tenido que ir a medir ciclos celulares y la amabilidad con las que nos atendía; y Soledad Montalbán y Óscar Sánchez del Servicio de Histología del CNB, por todos los cortes y tinciones realizadas de las diferentes muestras de las mamoesferas.

Por último, quiero agradecer a toda mi familia (padres, hermano, tíos, primas, abuelos), pero sobre todos a mis padres. Gracias por todo el apoyo y el ánimo que me han dado desde mi casa natal, Huelva, en todos los malos momentos que he pasado aquí, en Madrid. Siempre estaba mi madre dispuesta a venir a Madrid y estar conmigo consolándome y distrayéndome para que no pensara en ello. Salíamos a pasear, comer, comprar... Y también en todos los buenos momentos me han apoyado, se han alegrado y han disfrutado de verme feliz. Siempre recordaré todas las horas que he estado hablando con ellos por teléfono. Cuando les llamaba casi siempre respondían mis abuelos y siempre la misma pregunta, ¿cuándo vas a venir? Y yo respondía aún no sé, o en una semana o en dos, y cuando llegaba a mi casa todas mis primas, tíos y abuelos esperándome con muchas ganas de verme. No puedo olvidarme de toda la comida de mamá que me traía de casa cada vez que iba o me la traía Gonzalo el fin de semana que venía a Madrid y estaba deseando de ver todo lo que me enviaba porque siempre había alguna sorpresa que no me esperaba. Gracias por las visitas que he recibido de todas mis primas y las risas que hemos pasado, pero en especial la visita sorpresa de mi cumpleaños. No me la esperaba para nada y me hizo la mayor de las ilusiones.

Y a mi querido y fiel compañero, Gonzalo, que a pesar de la distancia hemos sabido llevar esta relación hacia delante. He pasado momentos muy duros sin ti cuando de verdad te necesitaba a mi lado, pero gracias al apoyo de todas tus palabras por teléfono o por Skype te he notado como si estuvieses a mi lado. Gracias al ánimo que me has transmitido he sido fuerte en muchos momentos en los que estaba agotada ya. Gracias por todas las idas y venidas desde Huelva a Madrid, muchas de ellas en secreto que me hicieron muchísima ilusión. Cada regalito que me traías, aunque fuese pequeño e insignificante, me alegraba y me sobraba para saber que tú no te olvidabas de mí y que yo era importante para ti. Y las tartas de chocolate blanco que me encantaban y me las traías siempre que podías y en ese mismo fin de semana me las terminaba porque me gustaban mucho. Qué buenas

estaban! Gracias por ser como eres y haber llevado así de bien esta relación en la distancia. Que pensándolo bien, no podemos quejarnos de cómo nos ha ido de requeitebién. Que sigamos así mucho tiempo más.

En resumen, muchísimas gracias a todos los que habéis participado en esta Tesis, de una manera u otra, porque sin vosotros no hubiese sido posible.